

PATRÍCIA RONDON PLEFFKEN DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DENTINÁRIO COM CLOREXIDINA,
ÁCIDO HIALURÔNICO OU VITAMINA C NA RESISTÊNCIA ADESIVA E
NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DA CAMADA HÍBRIDA**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Dentística.

Orientador: Profa. Tit. Maria Amélia Maximo de Araujo

Co-orientador: Profa. Dra. Maria Filomena Rocha Lima Huhtala

São José dos Campos

2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Maria Amélia Máximo de Araújo (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. César Rogério Pucci

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Titular Sérgio Ricardo Garcia Badini

Universidade Metropolitana de Santos - UNIMES

Profa. Dra. Ana Paula Martins Gomes

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 6 de dezembro de 2013.

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida e pela salvação em Jesus Cristo, por ser meu refúgio em momentos difíceis, por seu eterno amor por mim, por ter me sustentado emocionalmente e espiritualmente em todas as fases da minha vida, por ter cuidado de mim e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Ao meu marido André, que sempre me deu força em momentos que estive desanimada. Obrigada pela paciência, amizade e amor. Você torna os meus dias mais coloridos. Agradeço a Deus por você estar ao meu lado. Te amo!

Aos meus pais Edsel e Silvia, que são exemplos de amor e referência de vida. Pessoas que amo muito, a vocês todo meu respeito e gratidão.

Aos meus irmãos Daniel, Gabriela (cunhada-irmã) Cristiane e Talita por todo carinho e companheirismo, vocês são presente de Deus em minha vida.

Aos meus avôs, Edison e Maria que sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos, vibrando comigo em cada conquista. Muito obrigada por todos os mimos e carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Á minha orientadora Profa. Tit. **Maria Amélia Máximo de Araújo**, por acreditar e cuidar de mim, obrigada por toda orientação e apoio durante todo estágio deste trabalho, pessoa que sempre respeitei e admirarei pela sua competência indiscutível como profissional e hoje admiro ainda mais pela pessoa que é, nunca irei me cansar de te agradecer por tudo.*

A minha co-orientadora Profa. Maria Filomena R. Lima Huhtala que muito me ensinou, sempre compreensiva me apoiando em momentos difíceis com palavras de incentivo.

Às amigas do Curso de Pós-Graduação em Dentística: Beatriz, Daphne, Graziela, Natália, Luciana, Heleine, Monique, Ana Luiza, Tânia, Stella, Erika e Fernanda pelo incentivo constante, amizade e companheirismo.

A minha amiga Ten Camilla Bengston, pela amizade e pela imprescindível colaboração durante a fase experimental. Obrigada pelo carinho e amizade!

*A toda a minha família que conquistei na
Aeronáutica, que sempre torceu por mim, me incentivou e
vibrou comigo a cada vitória!*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, na pessoa do diretor Carlos Augusto Pavanelli.

Ao programa de Pós-Graduação em odontologia Restauradora, coordenado pelo Profa. Tit Márcia Carneiro Valera Garakis.

Aos professores: Prof. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves, Prof. César Rogério Pucci, Prof. Carlos Rocha Gomes Torres e Profa. Alessandra Bühler Borges, pela amizade e conhecimentos transmitidos durante estes 12 anos de Unesp desde graduação, estágio e pós-graduação.

Ao Prof. Ivan Balducci, pela realização da análise estatística.

As funcionárias do Laboratório Fernanda (Tiago) e Josiana, e a secretária Rosangela, pelo auxílio e colaboração em todas as partes deste estudo.

À todos da seção de Pós-graduação pelas informações e atenção prestada.

Ao laboratório do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia de São Paulo (USP), representado pela Profa. Dra. Miriam Lacalle Turbino que realizou os ensaios de nanoindentação.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo, que Deus abençoe a vida de cada um de vocês.

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor, e no céu, passavam cenas de minha vida. Para cada cena que passava, percebi pegadas na areia; Uma era minha e a outra do Senhor. Quando a última cena de minha vida passou diante de nós, olhei para as pegadas na areia, notei que muitas vezes no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia. Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis da minha vida. Isso me aborreceu ,e perguntei então ao Senhor:

-Senhor, Tu me disseste que, uma vez que eu resolvi Te seguir,Tu andarias sempre comigo, todo o caminho, mas notei que nos momentos das maiores atribulações do meu viver havia na areia dos caminhos da vida, apenas um par de pegadas.

- Não compreendo...Porque nas horas em que eu mais necessitava, Tu me deixastes?

O Senhor respondeu :

- Minha preciosa filha, Eu te amo e jamais te deixaria nas horas da tua prova e do teu sofrimento. Quando viste na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que

EU TE CARREGUEI EM MEUS BRAÇOS!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS.....	16
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	20
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 Hibridização.....	25
2.2 Diferentes substâncias utilizadas parar melhorar a união adesiva da resina composta à dentina.....	39
2.2.1 Clorexidina.....	39
2.2.2 Ácido hialurônico.....	52
2.2.3 Vitamina C.....	55
2.3 Nanoindentação.....	60
3 PROPOSIÇÃO.....	76
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.1 Materiais empregados.....	77
4.2 Preparo dos espécimes.....	78
4.3 Divisão dos grupos.....	80
4.4 Teste de microtração.....	85
4.5 Análise do padrão de fratura.....	86
4.6 Teste nanoindentação.....	87
4.6.1 Dureza.....	88
4.6.2 Módulo de Elasticidade.....	89
4.6.3 Aplicação da Técnica da nanoindentação.....	90
4.6.4 O Método Oliver-Pharr.....	93

4.7 Análise estatística.....	96
5 RESULTADOS.....	97
5.1 Teste de microtação.....	97
5.1.1 Estatística descritiva.....	97
5.1.2 Estatística Inferencial.....	99
5.1.3 Análise dos Padrões de fratura.....	101
5.2 Nanoindetação.....	103
5.2.1 Nanodureza.....	103
5.2.2 Módulo de elasticidade.....	106
6 DISCUSSÃO.....	107
6.1 Da Metodologia.....	107
6.2 Dos Resultados.....	116
7 CONCLUSÃO.....	124
8 REFERÊNCIAS.....	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	A) Sistema adesivo Adper Single Bond; B) Resina composta Filtek Z250.....	77
Figura 2 –	A) Dente bovino; B) Torno de alta rotação; C) Raiz seccionada; D) Coroa utilizada.....	78
Figura 3 –	A) Coroa seccionada; B) Politriz circular; C) Dentina exposta.....	79
Figura 4 –	A) Matriz de silicona; B) Coroa posicionada na matriz; C) Resina acrílica; D) Coroa embutida.....	79
Figura 5 –	A) Condicionamento ácido; B) Aplicação da substância experimental; C) Aplicação do sistema adesivo.....	82
Figura 6 –	Esquema representativo da divisão dos grupos experimentais.....	83
Figura 7 –	A) Matriz de silicone; B) Inserção da resina composta; C) Espécime finalizado.....	84
Figura 8 –	Confecção dos Palitos.....	85
Figura 9 –	A) Fixação individual do corpo-de-prova no dispositivo para teste de microtração; B) Corpo-de-prova fraturado.....	86

Figura 10 –	Curva típica de tensão versus deformação.....	89
Figura 11 –	A) Impressão da indentação; B) Indentador Berkovich...	90
Figura 12 –	Pontos de medição para nanoindentação.....	91
Figura 13 –	Representação esquemática da curva de carregamento e descarregamento.....	92
Figura 14 –	Perfil da superfície durante o carregamento máximo e após a retirada da carga, num teste de indentação instrumentada.....	93
Figura 15 –	Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) dos valores da resistência adesiva s as variáveis em estudo (G1: Controle; G2: Clorexidina; G3: Ácido hialurônico e G4: Vitamina C).....	98
Figura 16 –	Gráfico das médias – Ilustração dos efeitos: tratamento dentinário e efeito armazenamento.....	100
Figura 17 –	Gráfico de barras- % da redução de RA dos valores da resistência adesiva após 6 meses de armazenamento (G1: Controle; G2: Clorexidna; G3: Ácido hialurônico e G4: Vitamina C).....	100
Figura 18 –	Gráfico de colunas – classificação do padrão de fratura dos grupos.....	103
Figura 19 –	Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) dos valores de nanodureza da camada híbrida, obtidos pelos dife-	

rentes tipos de tratamento dentinário..... 104

Figura 20 – Gráfico de colunas (média±desvio padrão) dos valores de módulo de elasticidade da camada híbrida, obtidos pelos diferentes tipos de tratamento dentinário..... 106

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 –	Materiais, composições e fabricantes.....	77
Quadro 2 –	Divisão dos grupos conforme o tipo de tratamento realizado.....	83
Tabela 1 –	Análise Descritiva dos dados de microtração (MPa) s as estratégias adesivas obtida no período de 24 h.....	98
Tabela 2 –	Análise Descritiva dos dados de microtração (MPa) s as estratégias adesivas obtida n período de 6 meses.....	98
Tabela 3 –	Teste de análise de variância (ANOVA) a dois fatores	99
Tabela 4 –	Teste de Tukey (5%) para o efeito Tratamento dentinário em 24 h.....	101
Tabela 5 –	Teste de Tukey (5%) para o efeito Tratamento dentinário em 6 meses.....	101
Tabela 6-	Classificação quanto ao tipo de fratura (número de palitos).....	102
Tabela 7 –	Teste de análise de variância (ANOVA) a um fator.....	105

Tabela 8 –	Teste de Tukey para o efeito Tratamento dentinário em 6 meses.....	105
Tabela 9 –	Teste de análise de variância (ANOVA) a um fator	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH= ácido hialurônico
ANOVA = análise de variância
APMA= p-aminophenylmercuric acetate
°C = grau Celsius
Ca = cálcio
CO₂ = dióxido de carbono
C4S = condroitina-4-sulfato
CHX= clorexidina
DCM = Matriz Desmineralizada de Colágeno
GPa = Giga Pascal
GAGs = Glicosaminoglicanos
h = hora
HEMA = hidroxí etil metacrilato
K= quilo (10³)
Kg = quilograma
Kgf /cm² = quilograma força por centímetro quadrado
m = mili (10⁻³)
M= mega (10⁶)
μm = micrometro
MMPs = Metaloproteinases
MET = microscopia eletrônica de transmissão
4-META = 4-metacriloxietil trimelitato anidrido
MEV = microscopia eletrônica de varredura
μ = micro (10⁻⁶)
min = minuto
mj = milijoule

mm = milímetro

mm² = milímetro quadrado

MMA/TBB = metil metacrilato/tri-n-nbutil burano

MPa = mega Pascal

mRNA= ácido ribonucleico mensageiro

MTBS = Resistência à microtração

η = nano (10^{-9})

N = newton

NaOCl = hipoclorito de sódio

nm = nanômetro

RA= resistência adesiva

rpm = rotações por min

s = segundo

Vit C= vitamina C

Da Silva PRP. Influência do tratamento dentinário com Clorexidina, Ácido Hialurônico ou Vitamina C na resistência adesiva e propriedades mecânicas da camada híbrida [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influencia da Clorexidina, Ácido Hialurônico e Vitamina C na resistência adesiva à dentina e na propriedade mecânica (nanodureza e módulo de elasticidade) da camada híbrida. A dentina superficial de noventa e seis dentes bovinos foi exposta. Os espécimes foram divididos em quatro grupos (n=24) de acordo com o tratamento dentinário: G1 (Controle) - aplicação do sistema adesivo (Adper Single Bond 2); G2 - tratamento com solução de clorexidina a 2% por 1 min + sistema adesivo; G3 - tratamento de solução com Ácido Hialurônico 1% por 1 min + sistema adesivo; G4 - tratamento com solução de Vitamina C (Vit C) 10% por 1 min + sistema adesivo. Após polimerização do sistema adesivo foi aplicado duas camadas de resina composta Filtek 250 (3M ESPE) de forma incremental com auxílio de uma matriz e fotopolimerizada por 20 s cada. Em seguida, os espécimes foram armazenados em água destilada a 37°C por 24 h (n=12) e 6 meses (n=12). Após o período de armazenamento, os espécimes foram seccionados onde se obteve um espécime de aproximadamente 1 mm² de área. Foram submetidos ao teste de microtração em máquina de ensaio universal (DL-1000, EMIC/10 kgf/ 0,5 mm/min). Cinco espécime de cada grupo armazenado por 6 meses foi submetido ao teste de nanodureza e módulo de elasticidade da camada híbrida. Os dados foram submetidos aos testes estatísticos Anova 2 fatores e Tukey. No grupo após armazenamento 24 h mostraram que os maiores valores foram obtidos nos G1, G2 e G3, mas após 6 meses de armazenamento apenas o G2 e G3 apresentaram os maiores valores. Com relação às propriedades mecânicas o G3 apresentou o maior valor de dureza quando comparado aos demais grupos estudados. Não houve diferença estatística significativa quanto ao módulo de elasticidade entre os grupos. Concluímos que a aplicação da clorexidina e ácido hialurônico na dentina foi eficiente em manter os valores da resistência adesiva após 6 meses de armazenamento entretanto somente o ácido hialurônico apresentou o maior valor de nanodureza na camada híbrida.

Palavras-chave: Clorexidina. Ácido Hialurônico. Vitamina C. Resistência adesiva. Propriedades mecânicas. Dentina bovina.

Da Silva PRP. Influence of dentin treated with chlorhexidine, hyaluronic acid or vitamin c on the adhesive bond strength and on the mechanical properties of the hybrid layer [tese]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of chlorhexidine, hyaluronic acid and C vitamin C on dentin bond strength and on the hybrid layer mechanical properties. The buccal surface of ninety six extracted bovine teeth was ground to exposure a flat dentin surface. The specimens were divided in four experimental groups (n=24): G1 (Control) - application of the adhesive system (Adper Single Bond 2); G2: dentin treatment with chlorhexidine 2% for 1 min + adhesive system; G3: dentin treatment with hyaluronic acid 1% for 1 min + adhesive system; G4: dentin treatment with C vitamin 10% for 1 min + adhesive system. After polymerization of the adhesive system, two increments of the composite resin, Filtek Z 350 (3M ESPE), were placed on dentin with the aid of a matrix and polymerized for 20 s each. The specimens were stored in distilled water at 37°C for 24 h (n=12) and 6 months (n=12). They were then sectioned in order to obtain specimens with an area of approximately 1 mm². They were submitted to microtensile bond strength tests using a universal testing machine (DL-1000, EMIC/10 kgf/ 0,5 mm/min). One specimen of each of the groups stored for 6 months was submitted to nanohardness and elasticity module tests for the hybrid layer. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's test. Tests performed after 24 h showed higher adhesive bond strength for groups G1, G2 and G3, but after six months the highest values were presented by groups G2 and G3. Nanohardness tests revealed greater resistance for G3 compared to the other groups. Modulus of elasticity was found to be the same for all groups. It could be concluded that the application of chlorhexidine and hyaluronic acid on dentin was effective in keeping high bond strength values after 6 months but regarding the hybrid layer only hyaluronic acid increased nanohardness.

Keywords: Mechanical properties. Dentin. Nanoindentation technique. hybrid layer. Bond strength. Bovine dentin.

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da adesão é a união efetiva entre a estrutura dentária e o material restaurador, e a sua longevidade. Porém a degradação da interface adesiva continua sendo a grande responsável pela perda das restaurações em curto espaço de tempo, principalmente na dentina (Sano et al., 1999; Dos Santos et al., 2011).

Qualidade e uniformidade da camada híbrida, com boas propriedades mecânicas, dureza e módulo de elasticidade, são fatores importantes para se obter adesão e estabilidade favoráveis no tecido dentinário. No caso das restaurações adesivas, o bom selamento está relacionado com a capacidade que o material apresenta em resistir esforços mecânico imediatos, que ocorrem na contração de polimerização da resina composta, ou tardios devido a ações fisiopatológicas do aparelho estomatognático.

Estudos têm sido realizados com o uso de substâncias que mantenham a estabilidade do colágeno com objetivo de aumentar a união entre a restauração adesiva e a dentina. A biomodificação da dentina por meio de agentes bioativo pode melhorar a qualidade e a durabilidade da interface adesiva (Dos Santos et al., 2011). Para tanto, é importante pesquisar o comportamento físico-mecânico das interfaces adesivas criadas por estas substâncias para se obter o prognóstico restaurador destes tratamentos dentinário.

Entre os agentes bioativos estudados estão as substâncias consideradas inibidoras das metaloproteinases (MMPs), enzimas responsáveis pela degradação do colágeno, tornando-as inócuas ao colágeno exposto. As MMPs constituem uma família de proteases neutras, fundamentais na degradação da matriz extracelular em diversos processos fi-

siológicos e patológicos. Apresentam variação de atividade catalítica segundo o tipo de colágeno (Garcia-Godoy et al., 2007). Na matriz orgânica da dentina humana sadia já foi identificada inúmeras proteínas, nas quais estão incluídos alguns tipos de MMPs: MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-20, sendo essas, portanto, as MMPs relacionadas ao processo de degradação das uniões com a dentina. (Bourd-Boittin et al., 2005; Sulkala et al., 2007). Estudos recentes mostraram que a aplicação de inibidores de MMPs reduziu a solubilização da camada híbrida e diminuiu a progressão de lesões de cáries (Carrilho et al., 2007b; Pashley DH et al., 2011).

Na odontologia adesiva alguns estudos tem relacionado a clorexidina como inibidor destas enzimas, pesquisas têm demonstrado resultados promissores desta substância, confirmando a manutenção da resistência adesiva ao longo do tempo, com a inibição das MMPs (Osório et al., 2011; Stanislawczuk et al., 2011).

Na área da Dermocosmética, o Ácido Hialurônico (AH) e a Vitamina C (ácido ascórbico) tem sido amplamente utilizado como produtos cosméticos de aplicação tópica. O primeiro, por proporcionar efeito hidratante, estimular fibroblastos na produção do colágeno e ser extremamente bem tolerado, e o segundo por aumentar o nível de RNA-m dos colágenos I e III, ser co-fator de algumas enzimas de conversão e também atuar como agente antioxidante (Tezel, Fredrickson, 2008; Liao et al., 2005; Bogovic et al., 2011).

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo pertencente ao grupo dos glicosaminoglicanos, se faz presente na matriz extracelular do tecido conjuntivo frouxo, interage com várias macromoléculas incluindo as fibras colágenas e micromoléculas de forma a determinar sua permeabilidade à água (Fraser et al., 1997; Stern, 2008). A vasta aplicabilidade do AH deve-se à sua excelente característica higroscópica, ao seu ótimo comportamento reológico e à sua propriedade visco-elástica, o seu efeito hidratante pode favorecer a completa infiltração dos monômeros no colágeno exposto (Weindl et al., 2004; Liao et al., 2005). De acordo com Bo-

govic et al. (2011) o ácido hialurônico pode ser aplicado no tratamento de capeamento pulpar direto. Autores também relataram em estudos que o ácido hialurônico possui a capacidade de acelerar o processo de cicatrização e de aumentar a formação do colágeno do tipo I (Mendes et al., 2008, 2010; Li et al., 2012)

O colágeno é uma proteína fibrosa que apresenta estrutura longa, rígida com três cadeias polipeptídicas, chamadas cadeias V que se encontram entrelaçadas. Estes contêm dois aminoácidos que são característicos desta proteína: hidroxiprolina e hidroxilisina. A configuração helicoidal é estabilizada pela prolina, devido a sua estrutura em anel. Existem colágenos tipos I, II, III, V e XI, sendo que o colágeno tipo I é o mais abundante do corpo humano e está presente também na dentina (Blanck, Peterkofsky, 1975).

A vitamina C ou ácido ascórbico (AA) é considerada uma vitamina hidrossolúvel e os seres humanos são incapazes de sintetizá-la. Esta vitamina possui um papel importante na formação do colágeno, pois ela é um co-fator para hidroxiprolina e hidroxilisina (Geesin, 1988; Peterkofsky, 1991). Esta substância também possui característica antioxidante, agindo como neutralizante dos efeitos nocivos dos radicais livres, o que protege a integridade estrutural dos tecidos (Campo et al., 2004; Halicka et al., 2009). Este fato é importante, pois a presença de oxigênio pode facilitar o processo de degradação da matriz colágena da camada híbrida e também inibir a polimerização dos monômeros resinosos, prejudicando a longevidade da restauração (Gutteridge 1994; Hilton, Schwartz, 1995; Erhardt et al., 2011).

O conhecimento das propriedades elástica e plástica da interface de união é difícil, pois esta região possui dimensões muito pequenas. Atualmente as pesquisas buscam na nanociência, e mais especificamente na nanotecnologia, o conhecimento para alcançar este objetivo.

A análise da nanodureza e módulo de elasticidade são realizados através da técnica da nanoindentação. É uma técnica seletiva

e não destrutiva que fornece dados de materiais rígidos. Apesar da ampla utilização deste teste na física e engenharia, o seu uso na odontologia é muito recente. O teste consiste em ensaiar amostras utilizando penetradores de geometria conhecida sob condições controladas de carga, tempo e profundidade de penetração. A geração automática de curvas, força X profundidade de penetração, permite o acesso a diferentes propriedades mecânicas do material que está sendo pesquisado. A análise dos dados obtidos no teste de nanoidentação mais utilizado é o de Oliver e Pharr (1992), que resulta em dois parâmetros, módulo de elasticidade (E) e dureza (D). O equipamento utilizado para este teste possui alta resolução de medidas de carga (micro-Newtons) e deslocamento (nanômetros) (Van Meerbeek et al., 1993; Schulze et al., 2005).

Diante do exposto se faz necessário averiguar se as substâncias bioativas, citadas acima, interferem na resistência adesiva imediata; e após 6 meses de armazenamento e também nas propriedades mecânicas (nanodureza e módulo de elasticidade) da camada híbrida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar a compreensão do leitor, a revisão da literatura foi dividida em três tópicos principais: Hibridização; Diferentes substâncias utilizadas para melhorar a união adesiva da resina composta à dentina; e Nanoidentificação.

2.1 Hibridização

A formação da camada híbrida foi descrita pela primeira vez por Nakabayashi et al. (1982) em um estudo que verificava a efetividade da solução 4-META/metil metacrilato-tri-n-butil borano (MMA-TBB) associada a um agente condicionador composto pela união do cloreto férrico a 3% em ácido cítrico a 10%. Esta combinação de ácidos, conhecida como solução 10-3, além de remover totalmente a lama dentinária, desmineralizava a dentina subjacente em aproximadamente 5 μ m de profundidade. A diferença desta solução com as anteriores, é que as outras apenas tratavam a lama dentinária e não modificavam a dentina subjacente para receber os monômeros resinosos. Os autores utilizaram cilindros de esmalte e dentina humana e bovina condicionados, os monômeros resinosos hidrofóbicos e hidrofílicos (4-META), infiltraram-se entre as fibras colágenas expostas e, posteriormente, foram polimerizados. Os autores observaram, nas imagens em microscopia eletrônica de varredura, uma região mista abaixo da interface adesiva, com monômeros resinosos no interior da dentina desmineralizada e a denominaram camada híbrida.

Este estudo demonstrou que a adesão ocorria entre os agentes resinosos e as fibras colágenas.

Para conceituar agentes condicionadores e *primers*, Pashley DH (1992), observaram que a remoção da camada de *smear layer* pelo condicionamento ácido, ocasionam um aumento da permeabilidade da dentina, umidade superficial, potencial de irritação pulpar, desnaturação do colágeno e possível discrepância entre profundidade de desmineralização e capacidade de penetração do agente adesivo. Em virtude disso, os autores concluíram que o sistema adesivo deve ser hidrofílico, ter afinidade à água, com capacidade de penetrar tanto em dentina intertubular como em dentina peritubular. Os autores ainda acrescentaram que a profundidade de desmineralização causada pelo ácido depende não só do tempo de condicionamento, como também da concentração, tipo de ácido utilizado e concentração mineral do substrato em questão.

Testes *in vitro* de sistemas adesivos aplicados na dentina ainda requerem comprovação através de estudos clínicos de longevidade para avaliar sua efetividade. Van Meerbeek et al., em 1994 realizaram um estudo clínico com objetivo de avaliar, retrospectivamente, a eficácia clínica de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes (Scotchbond, Gluma, Clearfil New Bond, Scotchbond 2, Garantia e Tripton), e compararam os resultados clínicos obtidos com quatro sistemas adesivos convencionais (Bayer exp. 1 e 2, Clearfil Liner Sistema de Bond e Scotchbond multi-Purpose). No total, foram restaurados 1.177 lesões cervicais do tipo classe V em dentes de 346 pacientes. Os autores concluíram que à estratégia de adesão, os sistemas adesivos que removeram a camada de *smear layer* e conseqüentemente desmineralizaram a camada superficial da dentina revelaram melhor desempenho clínico que os sistemas que apenas modificaram esta camada sem sua completa remoção. A hibridação por infiltração dos monômeros resinosos pela camada de colágeno exposto da dentina, combinada com a formação dos *tags* na dentina, pa-

receu ser essencial para a resistência adesiva dentinária. Afirmaram ainda que a formação adicional de uma área de interface adesiva elástica, que funcione como amortecedor para a contração de polimerização e também a aplicação de uma resina composta com carga de partículas pequenas, garantiu um resultado clínico eficaz com relação a sua longevidade.

Sano et al. (1995), examinaram através do MEV uma nova modalidade de infiltração marginal denominada nanoinfiltração, estabelecida não entre a parede cavitária e o material restaurador, mas entre a camada de colágeno desmineralizado, sem ter sido impregnado por monômeros adesivos. Para tanto, foram utilizados terceiros molares não irrompidos, extraídos sobre os quais foram confeccionadas cavidades classe V, seguida da aplicação de cinco sistemas adesivos diferentes. A seguir, as cavidades foram restauradas. Realizado o isolamento dos espécimes, com exceção de 1 mm ao redor das restaurações, estes foram imersos por 8 h em solução fotoreveladora. Os resultados revelaram a penetração de prata através da dentina desmineralizada. A infiltração ocorreu via poros nanométricos (20 a 100 nm) abaixo da interface adesiva, mesmo na ausência de fendas. Concluíram que a camada híbrida era permeável, e apresentava porosidades de dimensões nanométricas. Assim, poderiam ocorrer infiltrações bacterianas e de outras substâncias prejudiciais à estrutura dentária, denominada pelos autores como nanoinfiltração.

Tay et al., em 1996 realizaram um estudo com o objetivo de ilustrar e definir a micromorfologia da interface resina-dentina, quando dois sistemas adesivos de frasco único water-free e à base de acetona (One-Step, Bisco, e Prime & Bond, Dentsply / LD Caulk) quando aplicados à dentina desmineralizada sob diferentes condições de adesão, à seco e úmida. Para isso foram utilizados quarenta e oito discos de 1 mm de dentina que foram condicionados com ácido fosfórico 10% e lavados por 20 s. Os discos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de acordo com a

condição de umidade restantes: Grupo I - A superfície da dentina foi suavemente seca com jato de ar, paralelo à superfície por 30 s, e com a distância de 20 cm; Grupo II - A superfície da dentina foi suavemente seca com jato de ar, paralelo à superfície por 3 s, e com distância de 20 cm; Grupo III - A superfície da dentina foi seca utilizando papel absorvente removendo o excesso de água; Grupo IV - Após o condicionamento e lavagem da superfície, 20 ml de água destilada foi adicionada à superfície de maneira que esta ficou totalmente coberta por água (*overwet*). Seis discos de dentina foram unidos com One-Step e o restante dos discos com Prime & Bond, resultando em oito sub-grupo. Os espécimes foram desmineralizados em EDTA e incluídos em resina epóxi para a análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os autores relataram que os espectros micromorfológicos dos dois sistemas adesivos foram praticamente semelhantes. Ambos foram afetados pela desidratação leve (3 s), que resultou na infiltração incompleta dos monômeros na região intertubular. A impregnação completa foi alcançada quando a rede de colágeno foi mantida úmida nesta mesma região.

Sano et al., em 1999, avaliaram a estabilidade da resistência adesiva e a morfologia da interface produzida por um sistema adesivo, aplicado *in vivo*, após diferentes períodos de tempo. Para esse estudo foi utilizado um primata adulto (*Macaca fuscata*), um ano antes de ser sacrificado, o animal foi anestesiado e em quatro dentes foram realizadas cavidades rasas classe V em dentina, que foram restauradas com o sistema adesivo Clearfil Liner Bond II (Kuraray) e resina Clearfil Photo Posterior (Kuraray). Após 180 dias foi realizado o mesmo procedimento restaurador em mais quatro dentes. Um dia antes de sacrificar o animal, este foi novamente anestesiado e os procedimentos realizados em mais quatro dentes. No dia seguinte os dentes foram cuidadosamente extraídos e armazenados em 37 °C por 24 h. Após este período, os dentes foram submetidos ao teste de microtração. As superfícies adesivas, após a fratura, foram observadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Não houve diferença significativa na resistência adesiva, que permaneceu estável em aproximadamente 19 Mpa durante um ano. As observações em MEV das superfícies fraturadas revelaram no topo da camada híbrida e dentro da resina adesiva, porosidades que aumentaram com o tempo de armazenamento.

Arrais e Giannini (2002) estudaram a morfologia e espessura da difusão da resina através da dentina desmineralizada ou sem condicionamento. Dezesesseis terceiros molares humanos foram armazenados em formalina a 2% por duas semanas e mantidos por 24 h em água destilada, antes do experimento. As raízes foram removidas e as coroas seccionadas no sentido mésio-distal, obtendo-se 32 hemi-coroas. A superfície oclusal foi removida até se obter 2 mm de remanescente dentinário, e lixas de carbeto de silício (600) foram utilizadas para regularizar a *smear layer*. Os espécimes foram divididos em quatro grupos de acordo com sistema adesivo: 1 - Sistema adesivo convencional de múltiplos passos (Scotchbond Multipurpose Plus –3M); 2 - Sistema adesivo convencional monocomponente (Single Bond – 3M); 3 - Sistema adesivo autocondicionante (Etch & Prime 3.0 – Degussa); 4 - Sistema adesivo autocondicionante (Clearfil SE Bond – Kuraray). Após a aplicação dos adesivos seguidos da inserção da resina, as amostras ficaram 24 h em água destilada a 37 °C. A superfície axial de cada amostra foi polida com lixa e óxido de alumínio e pasta de diamante. Em seguida foi aplicado ácido fosfórico a 37% por 5 s para facilitar a visualização da camada híbrida. Foram fixadas em solução de Karnovsky e tetróxido de ósmio, desidratadas em acetona e revestidas em ouro. Os autores utilizaram microscopia eletrônica para análise e concluíram que o adesivo Scotchbond seguido pelo Single Bond, apresentaram a camada híbrida mais espessa, em comparação com as finas e homogêneas camadas apresentadas pelos adesivos autocondicionantes.

Em 2002, Carrilho et al., testaram a resistência adesiva de quatro sistemas adesivos aplicados à dentina humana. Doze terceiros

molares tiveram o esmalte oclusal removido para a exposição de uma superfície plana de dentina e foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo 1 - Single Bond e P60 (3M Dental); Grupo 2 - Bond 1 e Surefil (Jeneric/Pentron); Grupo 3 - Prime&Bond NT e Alert (Dentsply); Grupo 4 - Prime&Bond 2.1 e TPH (Dentsply). Após 24 h de armazenagem em água destilada a 37 °C, os dentes sofreram cortes longitudinais perpendiculares para obtenção de espécimes de 0,8 mm² de área e 10 mm de comprimento e foram submetidos ao teste de microtração. Os pesquisadores não encontraram diferenças estatísticas significantes entre os adesivos testados. O Single Bond apresentou a menor evidência de espécimes que sofreram fratura precoce.

Em 2003, Tay e Pashley realizaram um estudo utilizando o MET para verificar a presença de canais de água (*"Water Treening"*) presentes ao longo da interface dentina/resina. Terceiros molares foram selecionados e seccionados no terço médio da coroa, expondo uma superfície dentinária profunda, abrasionada com lixa de granulação 180. Para análise em esmalte a superfície vestibular foi jateada com óxido de alumínio 50 µm, para remover a superfície aprismática. Diferentes tipos de sistemas adesivos foram utilizados. Se os autores a impregnação de prata nos adesivos, ocorre nos sítios hidrofílicos do material e nos finos canais deixados pela passagem de água, durante o fenômeno de permeabilidade dos adesivos. Os autores realizaram fotomicrografias eletrônicas de transmissão, obtidas na interface adesiva, tratada pela técnica de impregnação com nitrato de prata. Os resultados mostraram que todos os adesivos apresentaram certo grau de nanoinfiltração na camada híbrida. Canais de água foram observados na superfície da camada híbrida e se estendendo para dentro da camada de adesivo. Os autores concluíram que esses canais ao longo da interface, representam a incompleta remoção da água residual, os quais podem surgir como sítios de degradação hidrolítica da interface adesiva ao longo do tempo.

Susin et al., em 2003, compararam a espessura da camada híbrida formada por sistemas adesivos atuais sob influência de diferentes condições de substrato dentinário (úmido, desidratado e reumidificado). Para a realização deste estudo, foram utilizados 180 terceiros molares humanos hígidos, seccionados na altura do 1/3 médio da coroa dental. Os fragmentos foram divididos em seis grupos de acordo com sistema adesivo utilizado: 1- Scotchbond Multi Uso (3M); 2- Single Bond (3M); 3- Prime & Bond 2.1 (Dentsply); 4- One Coat Bond (Tokuyama); 5- Clearfil SE Bond (Kuraray) e 6- One Up Bond F (Tokuyama). As técnicas adesivas foram aplicadas nos respectivos substratos de acordo com as orientações dos fabricantes e duas camadas de resina composta Z250 (3M), de 1 mm cada, foram aplicadas sobre a área de teste. Os fragmentos foram seccionados e preparados para observação em MEV. Os resultados quanto à espessura de camada híbrida, mostraram que os sistemas adesivos que empregaram condicionamento ácido separadamente, tiveram comportamentos semelhantes em função dos substratos, sendo que em dentina úmida a espessura de camada híbrida encontrada, foi maior do que em dentina desidratada e reumidificada. Entretanto, os sistemas adesivos autocondicionante apresentaram diferentes performances, quando comparados aos primeiros, apresentando melhores resultados em dentina reumidificada. Consideram que as condições do substrato dentinário e os sistemas adesivos apresentaram interação e isso determina que as técnicas adesivas realizadas em dentina, previnam o colapso das fibras colágenas, que ocorre pela utilização de ar comprimido como meio de secagem.

Pashley DH et al., em 2004 afirmam que as fibrilas colágenas expostas pelo condicionamento ácido que não foram completamente impregnadas pelo adesivo são suscetíveis à degradação. A hipótese dos autores neste estudo é que a degradação ocorre na ausência de bactérias. Foram utilizados vinte e sete terceiros molares, O esmalte oclusal e a raiz dos dentes foram removidos e descartados. A superfície dentiná-

ria exposta foi condicionada com ácido fosfórico a 32% por 15 s, mas sem a aplicação do sistema adesivo. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com a forma em que os espécimes foram estocados. No grupo controle os espécimes foram armazenados em saliva artificial e no grupo experimental foram adicionados inibidores de enzimas proteolíticas. Cada grupo foi subdividido em três, de acordo com o tempo de armazenamento (24 h, 90 e 250 dias), as amostras foram examinadas medindo-se a extensão de degradação da DCM (matriz desmineralizada de colágeno). No grupo experimental (24 h) e no grupo controle (90 e 250 dias), foi observado 6 mm de espessura de DCM. As DCMs foram praticamente destruídas nas amostras do grupo experimental de 250 dias, porém no grupo em que as amostras foram incubadas com inibidores da enzima ou óleo mineral estas não foram destruídas. Na análise funcional foi observado pelos autores que a atividade colagenolítica foi diminuída por inibidores de protease ou pela clorexidina 0,2%. Os autores concluíram que a degradação do colágeno ocorreu ao longo do tempo através das metaloproteinases, que são liberados lentamente ao longo do tempo.

Cho e Dickens (2004) investigaram a hipótese de que a variação do conteúdo de acetona de sistemas adesivos dentinários pode afetar a espessura da camada adesiva e resistência à microtração (MTBS), e verificaram se a espessura da camada adesiva é um indicador válido para MTBS. Adesivos dentinário experimental foram preparados com 27, 37, 47, 57 ou 67% de acetona e foram utilizados para adesão da resina composta em superfícies de dentina na oclusal de molares humanos. A espessura da camada adesiva foi determinada por análise de imagens digitalizadas. A MTBS foi medida após 48 h. As superfícies de fratura foram observadas em MEV. Com o aumento do teor de acetona, a MTBS variou de 38 MPa (acetona 67%) para o maior valor MTBS de 64 MPa (acetona 37%), enquanto que a espessura da camada adesiva decresceu linearmente. Ambas as variáveis dependentes mostraram corre-

lação inversa com o teor de acetona ($p < 0,0001$), mas não foram correlacionados entre si ($P > 0,05$). Noventa e quatro por cento das amostras apresentaram fraturas na camada adesiva estendendo para as interfaces com a camada híbrida ou a resina composta. Nos grupos contendo 57 e 67% de acetona, as fraturas foram observadas nas interfaces. Em vez da espessura da camada adesiva, trincas interfaciais na amostras contendo adesivos ricos em acetona pode ter causado MTBS inferiores. Os autores concluíram que a menor concentração de acetona, devido a evaporação do solvente durante o uso clínico do sistema adesivo, não parecem diminuir MTBS, mas sim melhorar a integridade da interface adesiva.

Em 2007, Hosoya et al., avaliaram as propriedades biomecânicas e a dureza e módulo de elasticidade, da dentina decídua condicionada por sistema adesivo de um passo. Foram utilizados seis dentes sem cáries e seis dentes cariados. Para os dentes saudáveis, as superfícies oclusais foram desgastadas para expor a dentina superficial. Nos dentes cariados, a dentina infectada foi corada com um detector de cáries e removida em baixa rotação com refrigeração constante. Foi aplicado sobre a dentina preparada o sistema com One-Up Bond F Plus (Tokuyama Dental Co., Tóquio, Japão). A interface resina-dentina e a dentina abaixo da interface foi medida com um nanoindentador e observada com SEM e TEM. Para ambos os dentes cariados e saudáveis não houve diferença significativa na dureza da dentina a 10-80 μm abaixo da interface. A dureza da dentina na região da interface foi significativamente menor na dentina cariada do que na não-cariada. Quanto ao módulo de elasticidade da dentina interfacial, ambos os substratos apresentaram valores significativamente mais baixos do que a dentina subjacente. Além disso, o módulo de elasticidade da dentina interfacial foi significativamente menor na dentina afetada. A camada híbrida nos dentes cariados foi mais espessa e exibia características morfológicas mais complexas.

Pashley et al., em 2007 realizaram uma pesquisa cujo objetivo foi revisar o uso de um modelo de adesão de uma nova resina cha-

mada macro-híbrida, foi avaliado a sua penetração, contração e evaporação do solvente. Relataram também que a matriz dentinária é muito sensível, principalmente na secagem com jato de ar, onde ocorre o colapso das fibras colágenas que impede a infiltração dos monômeros resinosos. Os autores introduziram também um novo conceito da utilização do etanol como solvente, onde a presença de água após a desmineralização da dentina é trocada pelo etanol durante o processo adesivo o que facilitaria a penetração dos monômeros do sistema adesivo.

Ermis et al. (2008) avaliaram a resistência de união através de teste de microtração, utilizando um sistema adesivo de condicionamento total (controle) e três sistemas adesivos autocondicionantes com diferentes níveis de acidez (forte, médio e fraco) em dentina preparada com três pontas com diferentes granulações (média, fina e extrafina). Foram utilizados os sistemas adesivos autocondicionantes Adper Prompt L-Pop, 3M ESPE, (AP), de um passo com ácido forte; Clearfil SE Bond, Kuraray, (CSE) de dois passos com acidez média; Clearfil S3 Bond, Kuraray, (CS3) de um passo com acidez fraca e o sistema adesivo OptiBond FL, Kerr, (OB) de condicionamento total de três passos (grupo controle). Foram utilizados dentes humanos extraídos, onde as coroas foram seccionadas no terço médio. Após a dentina ser exposta, os espécimes foram divididos em três grupos de acordo com o preparo da dentina com pontas de granulação média, fina e extrafina. Os quatro sistemas adesivos foram aplicados em três dentes de cada grupo de acordo com as especificações dos fabricantes. Em seguida foi aplicada resina composta em incrementos, na superfície de dentina preparada com espessura de 5-6 mm. Os espécimes foram mantidos por 24 h em água destilada a 37 °C. Os dentes foram cortados perpendicularmente em pequenos retângulos de aproximadamente 0,90 mm² de secção transversal. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA dois fatores, post hoc Tukey com comparação múltipla. Os resultados obtidos mostraram que os diferentes tipos de granulação das pontas não afetaram as propriedades mecânicas da interfa-

ce, exceto para o sistema adesivo autocondicionante CS3 de acidez fraca de um passo, que obteve um resultado melhor ($34,4 \pm 22,3$ MPa) quando foi utilizada uma ponta de menor granulação no preparo da dentina. Conclui-se neste estudo que para os sistemas adesivos de condicionamento total OB e autocondicionante de acidez forte, o tipo de ponta utilizada não influenciou na eficácia da adesividade. Entretanto, nos sistemas adesivos (CS3) de acidez fraca a adesividade pode ser significativamente aumentada utilizando as pontas de granulação fina para acabamento.

Albaladejo et al. (2010) avaliaram a eficácia na formação de tags de resina, ramos laterais e da camada híbrida de cinco sistemas adesivos (Single Bond -SB-; Prime & Bond NT -PNT-; Clearfil SE Bond -SEB-, Protect Bond -PB-Etch & Prime 3.0 -EP). Superfícies planas de dentina de 25 molares foram tratadas com os sistemas adesivos de acordo com as instruções dos fabricantes. Em seguida foi aplicada resina composta na forma incremental. Os espécimes foram seccionados paralelamente ao longo eixo. Uma parte foi tratada com ácido fosfórico e hipoclorito de sódio a fim de revelar a formação da camada híbrida. A outra metade foi armazenada em ácido clorídrico a 30% para detectar a formação de tags e ramo lateral de resina. Os dois adesivos convencionais apresentaram camadas híbridas mais espessas do que aqueles encontrados em sistemas adesivos autocondicionantes, porém eram contínuas e uniformes de espessura em todos os adesivos. Os adesivos convencionais formaram maior número de tags de resina do que os adesivos autocondicionantes. Formação do ramo lateral foi observada nos adesivos convencionais e no adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond (SEB). Os autores concluíram que o SEB apresentou infiltração de resina adequada.

Sarr et al., em 2010, avaliaram mecanicamente e morfológicamente, 11 diferentes sistemas adesivos aplicados sobre a dentina. A ultra-estrutura resultante da interface dentina/adesivo foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Terceiros molares humanos tiveram a dentina superficial exposta. Os adesivos selecionados foram

aplicados conforme as instruções do respectivo fabricante, para a medição da resistência à microtração (MTBS) após armazenamento em água a 37 °C por 24 h, ou para caracterização interfacial (MET). A MTBS variou de 11,1-63,6 MPa; os maiores valores obtidos foram do adesivo convencional três passos e os menores com adesivos autocondicionantes de um passo. Na avaliação morfológica (TEM), mostraram padrões de interação muito diferente, especialmente para os adesivos autocondicionantes. Os autores concluíram que quando ligado à dentina, os adesivos com os procedimentos de aplicação simplificada (em particular, autocondicionante de único passo) ainda possuem um desempenho inferior em relação aos convencionais.

Sabemos que o procedimento de preparo cavitário realizado por instrumentos rotatórios forma uma camada amorfa na superfície dental denominada *smear layer* ou lama dentinária, contendo fibras colágenas, cristais de hidroxiapatita, além de sangue, saliva e bactérias. A presença da *smear layer* aderida à superfície dentinária pode comprometer a adesão, sendo indicada sua remoção através do condicionamento ácido total e hibridização da dentina para produzir interfaces adesivas mais seguras e duráveis. Contudo, estudos desenvolvidos com sistemas adesivos autocondicionantes, baseados na incorporação da *smear layer* à camada híbrida, têm obtido resultados promissores em relação à adesão, eliminando o risco de impregnação incompleta do colágeno desmineralizado, como se observa comumente com os sistemas convencionais. Todavia, devido à sua menor acidez, a efetividade destes materiais pode ficar prejudicada, levando a resultados inferiores em relação aos sistemas que empregam o condicionamento total. Baseado nisso, Pleffken et al. (2011) avaliaram a influência de modificações na técnica de aplicação dos sistemas adesivos autocondicionantes sobre a resistência adesiva à dentina, visando melhorar a seu desempenho. Foram utilizados 255 dentes bovinos que foram embutidos em resina acrílica e tiveram a superfície vestibular desgastada até a exposição da dentina. Eles foram divididos em quatro grupos expe-

rimentais, dependendo do sistema adesivo autocondicionante aplicado, e um grupo controle que recebeu um adesivo que utiliza condicionamento ácido total. Cada grupo experimental foi dividido em quatro subgrupos, recebendo a aplicação de uma ou duas camadas dos sistemas autocondicionantes, de forma ativa ou passiva. Foram confeccionados sobre a área de adesão cilindros de resina composta Z250 (3M/ESPE, St. Paul, Mn, USA). Os espécimes foram submetidos ao ensaio de cisalhamento e os dados analisados estatisticamente. Os autores concluíram que a aplicação dos sistemas adesivos de forma ativa promoveu uma melhora significativa na resistência adesiva à dentina em relação à aplicação de forma passiva.

Yassen et al. (2011) realizaram um estudo com objetivo de analisar estudos *in vitro* e *in situ*, que compararam diretamente o uso de dentes bovinos como um substituto para dentes humanos em experimentos odontológicos. A pesquisa foi incluiu artigos publicados de 30 de dezembro de 1953 até 2010, com as seguintes palavras-chave: "dente, bovino, humano" ou "dentina, bovino, humano" ou "esmalte, bovino, humano". Os resumos dos trabalhos resultantes da pesquisa com estas palavras-chave foram analisados. Apenas artigos originais escritos em inglês e comparando diretamente substratos humanos e bovinos foram incluídos na revisão. A pesquisa foi complementada por busca manual das referências de cada artigo identificado. De 76 estudos inicialmente selecionados, 68 preencheram os critérios de seleção para a inclusão. Os estudos foram separados em 7 categorias: morfologia dental, composição química, propriedades físicas, cárie dentária, erosão/abrasão dentária, resistência adesiva e microinfiltração marginal. Os autores concluíram que existem dados inconsistentes, sobre se dentes bovinos podem ser considerados um substituto apropriado para os dentes humanos, na pesquisa odontológica. Morfológica, composição química e diferenças de propriedades físicas entre os dois substratos devem ser considerados na inter-

pretação dos resultados obtidos a partir de qualquer experimento com substrato de dente bovino.

Sistemas adesivos atuais oferecem resultados imediatos favoráveis em termos de resistência adesiva. No entanto, a durabilidade das restaurações adesivas tem sido vista como um grande problema. Parece que a simplificação das técnicas adesivas, prejudica a estabilidade ao longo do tempo da interface resina-dentina. A pressão hidrostática pulpar, o fluxo do fluido dentinário e a umidade na dentina pode afetar a interação íntima de alguns monômeros resinosos dos sistemas adesivos com o tecido dentinário. Degradação na camada híbrida ocorre através da absorção da água, esta provoca a hidrólise das ligações dos monômeros, e consequentemente ativação das metaloproteinases endógenas, presentes na interface dentinária. Manuja et al. (2012) relataram nesta revisão de literatura que as etapas realizadas nos adesivos convencionais continuam sendo o padrão ouro em termos de durabilidade.

Scheffel et al., em 2012 realizaram um estudo para determinar o efeito do tempo de condicionamento ácido na dentina na solubilização do cálcio. Foram realizados desgastes na superfície oclusal obtendo superfícies planas de dentina exposta em dentes decíduos ($n = 8$) e em dentes permanentes livres de cárie ($n = 8$). Três áreas de 2 mm de diâmetro foram delimitadas em cada superfície e atribuída a 5, 10 ou 15 s de condicionamento ácido. Cinco microlitros de H_3PO_4 a 35%, foram aplicados em cada área, durante os tempos predeterminados, e 4 microlitros foram recuperados para análise. A quantidade de cálcio foi determinada colorimetricamente usando reagente de Arsenazo III e expressa como $\mu\text{g Ca/mm}^2$ da dentina. Os dados foram submetidos a ANOVA 2 fatores, e teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). Para a dentina dos decíduos e permanentes, foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre o tempo de condicionamento ácido e concentração de cálcio (decíduo $R^2 = 0,79$; permanente $R^2 = 0,73$). Valores de média (DP) da dentina decídua desmineralizada após 5, 10 e 15 s, foi de 1,00 (0,25); 1,74 (0,11) e 2,30

(0,42), ao passo que para a dentina permanente, os valores foram 0,47 (0,13) 0,89 (0,36) e 1,38 (0,20) mcg Ca/mm², respectivamente. Observaram um aumento diretamente proporcional ao tempo de condicionamento nas duas dentinas analisadas. Mais solubilização de cálcio ($P < 0,05$) foi detectada para a dentina decídua do que para na dentina permanente, depois de todos os tempos de condicionamento ácido.

2.2 Diferentes substâncias utilizadas para melhorar a união adesiva da resina composta à dentina: Clorexidina, Ácido hialurônico e Vitamina C

2.2.1 Clorexidina

Gendron e colaboradores (1999) avaliaram o efeito inibitório da clorexidina (CHX) na atividade das: MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B) e MMP-8 (colagenase 2). Foram usadas 1,5 U/ml MMP-2 em 50 mM NaCl –20mM Tris-HCl, e 20 µg/ml de MMP-9 em 5 mM Tris-HCl, contendo 0,1 mM CaCl₂, Brij 35 e glicerol 10%. Ambas gelatinases foram ativadas após incubação por 30 min a 37°C em 0,5 mM de *p*-aminofenil mercúrio acetato (APMA). As MMPs-2 (3 µl) e 9 (5 µl) ativadas foram incubadas com 10 µl de CLX e 5 µl de 50 mM Tris-HCl por 30 min em temperatura ambiente. As concentrações finais de CLX preparadas em água destilada testadas, foram 0,03%, 0,015%, 0,008%, 0,004%, 0,002% e 0,0001%. EDTA 10 mM foi usado como controle na inibição da atividade das MMPs -2 e -9. Após a incubação, as amostras foram aquecidas por 30 min a 60°C na presença de solução tampão de eletroforese e as proteínas coradas. O efeito inibitório da CLX foi analisado na presença de 0,75 mM CaCl₂, que foi adicionado ao ensaio. A atividade da MMP-8

foi tratada ou não tratada com 0,005; 0,01 ou 0,02% de CLX e incubada com 1,5 μ M de colágeno tipo I a 3 mg/ml em 50 mM Tris-HCl – 0,2 M NaCl – 0,5 mM CaCl_2 por 12 h a 22°C. Produtos da quebra do colágeno foram testados por eletroforese e corados. Sendo avaliados na ausência ou presença de 1 mM APMA, ativador da MMP-8 latente. A concentração de CLX a 0,03% inibiu completamente a atividade das MMPs 2 e 9, sendo sua ação inibidora dependente da concentração. A dose mínima capaz de inibir a atividade da MMP-9 foi de 0,002%, a MMP-2 foi mais susceptível a ação inibidora sendo inativada por uma concentração de 0,0001%. A atividade da MMP-8 sem APMA foi completamente inibida pela CLX 0,02% e 0,01%. Os autores concluíram que o efeito inibitório da clorexidina sobre as metaloproteinases ocorre através de uma ação quelante, ou seja, sequestradora de cálcio.

Hebling et al. (2005) avaliaram a degradação da interface adesiva usando um sistema adesivo convencional associado ou não a CLX após o condicionamento com ácido fosfórico. Vinte e oito crianças (8 – 12 anos) com molares decíduos bilaterais cariados, que necessitavam de preparos foram selecionadas, sendo que somente 11 delas foram selecionadas pelos dentes que permanecerem na cavidade oral 6 meses, antes de serem extraídos. Oito das 11 crianças tiveram pelo menos um dos dois dentes restaurados esfoliados antes de 6 meses, sendo retirados da pesquisa. No grupo controle foi aplicado o ácido fosfórico por 15 s, em seguida recebeu o sistema adesivo Single Bond e restauração com resina composta. O Grupo experimental recebeu tratamento semelhante ao grupo controle, porém previamente ao sistema adesivo foi aplicado a clorexidina 2%. Após 6 meses os dentes decíduos foram extraídos, e seccionados em 4 partes de 1,0 mm. Duas amostras de cada dente foram selecionados aleatoriamente e imersos em solução de nitrato de prata a 50%, por 24 h e em seguida avaliados em MET. As amostras restantes foram completamente desmineralizados e tiveram também sua interface adesiva avaliada. Houve uma maior extensão de depósitos de nitrato de prata nas

amostras do grupo controle que não foi desmineralizados. Os grupos em que foram aplicados CLX e desmineralizados para análise, apresentaram uma camada híbrida sem falha com a rede de fibras colágenas intactas, enquanto no grupo controle que foi desmineralizado apresentou falhas no interior da camada híbrida e degradação da rede de fibras colágenas. Os autores concluíram que a clorexidina evita a degradação da matriz colágena dentinária da camada híbrida, *in vivo*.

Em 2007 Brackett et al. avaliaram através de MET e microtração a degradação de camada híbrida de restaurações adesivas na face oclusal quando a dentina foi tratada com clorexidina, um estudo *in vivo*. Premolares hígidos que tinham indicação a extração ortodôntica foram preparados, restaurados e avaliados após dois ou seis meses respectivamente. O sistema adesivo empregado foi o Single Bond. Somente o grupo experimental recebeu aplicação de uma solução a 2% de digluconato de clorexidina, previamente ao sistema adesivo. Após as extrações, cada dente foi seccionado em quatro fatias no sentido vestibulo-lingual com 1 mm de espessura cada. Duas fatias foram analisadas em MET. Com o objetivo de confirmar que a aplicação da clorexidina não alterou a resistência adesiva, nas outras duas fatias foi realizado o teste de microtração. A resistência adesiva foi calculada, e os dados foram analisados estatisticamente. Os resultados revelaram que nenhuma degradação na camada híbrida ocorreu em ambos os grupos após dois meses. Leve degradação foi observada no grupo de controle após seis meses, mas não foi observado no grupo experimental. A utilização de uma solução de clorexidina, previamente a aplicação do sistema adesivo parece não ter efeitos prejudiciais tanto para a resistência adesiva ou na manutenção clínica de restaurações Classe I de resina composta após dois meses e seis meses.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são proteinases que participam da degradação do colágeno da camada híbrida e consequentemente ocasionam a diminuição da resistência adesiva. Carrilho et

al. (2007a) verificaram se as falhas que ocorrem na camada híbrida que compromete a estabilidade da interface adesiva poderiam ser desaceleradas na presença da clorexidina pela inibições das MMPs evitando assim a degradação da interface adesiva. Para isso foram realizadas cavidades classe I em sete terceiros molares, que foram seccionados em duas hemicoas no sentido vestibulo-lingual. Metade de cada dente foi restaurado de acordo com as recomendações do fabricante e a outra foi tratada com a substância bioativa clorexidina 2% após o condicionamento ácido por 1 min, em seguida o excesso de solução foi removido com papel absorvente, e restaurados da mesma forma que grupo não tratado. Após o procedimento restaurador os dentes foram armazenados em água destilada a 37°C durante uma semana. Então, os dentes foram seccionados longitudinalmente para obtenção dos palitos. De 8 a 10 palitos foram obtidos. Um terço dos espécimes foram testados imediatamente, enquanto que os palitos restantes foram aleatoriamente divididos e armazenados a 37 °C durante 6 meses em saliva artificial (pH 7,1) contendo ou não inibidores da enzima proteolítica. O meio de armazenamento foi substituído semanalmente. Após o tempo de armazenamento determinado os espécimes foram fraturados para obter o valores de resistências adesiva. O pré-tratamento com clorexidina não prejudicou a resistência adesiva dos espécimes testados no período imediato. O armazenamento de seis meses resultou na redução significativa da resistência adesiva de todos os grupos. Armazenamento em saliva artificial sem inibidores da protease reduziu a resistência adesiva no grupo controle em 45,3%. No grupo da clorexidina a resistência adesiva foi significativamente maior com redução de apenas 23,4%. O armazenamento em saliva artificial contendo inibidores de protease não afetou a resistência adesiva quando comparado com aqueles armazenados em saliva artificial sem inibidores de protease. O tipo de fratura que mais ocorre nas amostras do grupo controle, independentemente da solução de armazenamento e do tempo, ocorreu na camada híbrida. No entanto, depois de 6 meses de armazenamento, a falha no

grupo da clorexidina foi predominantemente nas camadas adesiva e resina composta. Os autores relataram que tal fato demonstra a manutenção da matriz colagenosa da camada híbrida. Os autores concluíram que a clorexidina é grande valia para a preservação da camada híbrida ao longo do tempo.

Bengston et al. (2008) avaliaram *in vitro* a influência da solução de digluconato de clorexidina 2% na adesão de dois sistemas adesivos (convencional e autocondicionante) à dentina de molares humanos. Foram utilizados 40 terceiros molares humanos livres de cárie, com a face oclusal lixada até a exposição dentinária. Os dentes foram divididos em 4 grupos (n=10) de acordo com o sistema adesivo utilizado e tratamento: G1 – Controle do sistema adesivo convencional (Single Bond); G2 – Controle do sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond; G3 – Aplicação da clorexidina + Single Bond; G4 – Aplicação da clorexidina + Clearfil SE Bond. Em seguida foi realizada a restauração com resina composta e os dentes foram armazenados em água destilada à 37 °C por 24 h. As amostras foram seccionadas para obtenção dos palitos, que foram tracionados em máquina de ensaios universal. Os resultados de resistência adesiva foram analisados usando os testes estatísticos ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Fatias de dentina foram obtidos de 3 dentes adicionais e as superfícies submetidas aos mesmos tratamentos realizados para o teste de microtração e foram observadas em MEV. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos controles (G1 = $31,52 \pm 6,24$ e G2 = $42,88 \pm 2,31$) e os grupos tratados com clorexidina (G3 = $34,41 \pm 6,92$ e G4 = $40,14 \pm 2,91$). A solução de clorexidina 2% não interferiu na resistência de união dos sistemas adesivos utilizados.

Beraldo e Andrade em 2008 realizaram um estudo em que analisaram as meta-análises e ensaios clínicos randomizados indexados no Medical Literature Analysis and Retrieval System e Cumulative Index para Enfermagem e bancos de dados Literatura Allied Health sobre o uso tópico de clorexidina na prevenção da pneumonia associada a ven-

tilação mecânica(PAV). Oito publicações foram analisadas, em sete delas (87,5%) a clorexidina diminuiu a colonização da orofaringe, e em quatro (50%), houve uma redução de PAV. Os autores concluíram que a clorexidina pode diminuir a colonização de bactérias, reduzindo assim a incidência de PAV.

Em 2009 Breschi et al. avaliaram o efeito da clorexidina (CLX) a 0,2% e 2% sendo aplicado como um primer terapêutico na adesão de sistemas adesivos convencionais. Cento e oito terceiros molares livres de cárie tiveram o esmalte e dentina superficial oclusal. As superfícies foram condicionadas com ácido fosfórico por 15 s. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n= 18) de acordo com o tratamento de superfície: G1-CLX 0,2% aplicado antes do sistema adesivo Adper Scotchbond 1XT (SB1); G2- CLX 2% aplicado antes do sistema adesivo SB1; G3- aplicação do sistema adesivo sem tratamento dentinário (controle); G4- CLX 0,2% aplicado antes do sistema adesivo XP-Bond (XPB); G5- CLX 2% aplicado antes do sistema adesivo XPB e G6- aplicação do XPB sem tratamento prévio (controle). A CLX foi aplicada na superfície condicionada por 30 s e levemente seca. Aplicação dos sistemas adesivos foi de acordo com as instruções dos fabricantes e em seguida foi realizada a restauração adesiva com RC. Foi então realizada a secção dos espécimes para obtenção dos palitos, que foram subdivididos em 3 grupos de armazenamento (por 24 h, 6 meses e 12 meses em saliva artificial a 37 °C). Após cada período de armazenamento foi realizado teste de microtração. Os grupos SB1 e XPB apresentaram valores imediatos de resistência adesiva semelhantes com ou sem tratamento com CLX. Após 6 meses os controles que não receberam tratamento com CLX apresentaram menor valor de resistência adesiva. Após 12 meses os controles tiveram redução da resistência adesiva em 54% (SB1) e 65% (XPB), enquanto os grupos tratados com CLX reduziram a resistência adesiva em 21% e 32%, respectivamente. As duas concentrações de CLX não apresentaram diferença estatística com relação ao tempo de armazenamento ou tipo de

sistema adesivo utilizado ($p > 0,05$). Doze espécimes ($n= 2$) adicionais foram preparados para análise de nanoinfiltração, e mostraram que após 6 e 12 meses houve um aumento da nanoinfiltração nos grupos controles, enquanto nos grupos tratados com CLX apresentaram pouca nanoinfiltração em ambas concentrações e sistema adesivo. Com isso, os autores concluíram que fatores endógenos responsáveis pela degradação da interface adesiva podem ser inibidos pela CLX.

Loguercio et al. (2009) analisaram a influencia na preservação da interface adesiva tratada com CLX em diferentes concentrações e tempo, usando sistemas adesivos convencionais: Adper Single Bond e Prime & Bond. Cento e vinte terceiros molares hígidos tiveram a dentina oclusal exposta. Experimento 1- Metade dos espécimes foram subdivididos em 6 grupo ($n=10$) de acordo com o pré-tratamento, ou seja, condicionados com ácido fosfórico a 37%, por 15 s, lavados por 15 s, secos e rehidratados com água (controle), CLX a 0,002%, 0,02%, 0,2%, 2% e 4% por 60 s. A aplicação dos sistemas adesivos e das restauração com RC, seguiram as especificações instruções dos fabricantes. Experimento 2- Os outros 60 dentes foram subdivididos em 6 grupos, sendo que após o condicionamento ácido, foram rehidratados com água (controle), CLX 0,002% e 2% por 15 s, aplicação do sistema adesivo e restauração com RC. Os espécimes foram seccionados em palitos e divididos aleatoriamente para o teste de microtração. Metade dos espécimes ($n= 5$) foram testados imediatamente e a outra metade após 6 meses de armazenamento em água destilada 37 °C. No primeiro experimento, o grupo controle teve sua resistência adesiva reduzida após reidratação. Na segunda etapa, houve uma redução significativa na resistência adesiva em ambos os sistemas adesivos quando rehidratados com água. No entanto, a reidratação com CLX em diferentes concentrações e tempo de armazenamento após 6 meses manteve a interface adesiva estável. Os autores concluíram que o uso da CLX 0,002% por 15 s, pode ser suficiente para preservar a interface adesiva dentinária por 6 meses.

Chang e Shin (2010) analisaram o efeito da clorexidina (CLX) com relação ao tipo de aplicação na interface adesiva dentinária. Cinquenta molares hígidos tiveram a superfície oclusal desgastada para exposição da dentina. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n= 10). G1: tratamento da cavidade com CLX 2% por 20 s, lavagem com água por 20 s e condicionamento com ácido fosfórico 37% por 10 s, lavagem por 10 s, leve secagem por 10 s, aplicação do sistema adesivo Singe Bond 2 s o fabricante e restauração adesiva; G2: semelhante ao grupo 1, mas a CLX não foi removida; G3: CLX 2% aplicada após o condicionamento ácido, por 20 s, e lavagem por 20 s; G4: CLX 2% aplicado de forma semelhante ao grupo 3, sem lavagem; G5: grupo controle, sem tratamento da CLX. Os grupos foram subdivididos em dois subgrupo de acord com o tipo de armazenamento: em água por 24 h e submetidos a 10.000 ciclos de termociclagem. Os espécimes foram seccionados longitudinalmente para obtenção de palitos para o teste de microtração, que mostraram que o tratamento com CLX não alterou a resistência adesiva *in vitro*, no entanto a termociclagem reduziu significativamente a força adesiva no grupo controle ($p < 0,001$). O Pré tratamento com a clorexidina não afetou a RA no grupo imediato, quando commparado com o grupo controle. Entretanto, após a ciclagem uma redução significativa foi observada no grupo controle. Em geral, a aplicação Ca CLX não apresentou diferença estatística significativa. No entanto, houve diferença significativa após a termociclagem nos grupos tratados com CLX antes do condicionamento e não houve diferença significativa nos grupos tratados com a CLX após o consdicionamento.

Breschi et al., em 2010 realizaram um estudo que avaliou o papel das MMPs dentinárias na degradação das fibras colágenas na interface adesiva com ou sem tratamento com CLX. Para isso, 10 molares sem cáries foram selecionados, e tiveram a dentina superficila exposta que foi pulverizada em nitrogênio líquido para obtenção do pó de dentina, obtendo-se 5 alíquotas com 1 g cada: G1- dentina mineralizada sem tra-

tamento; G2- dentina desmineralizada por 10 min em 1% de ácido fosfórico; G3- dentina mineralizada tratada com 3 ml de Adper Scotchbond 1XT (SB1XT) por 24 h a 4 °C; G4 e G5- dentina mineralizada tratada previamente com 0,2% e 2% de CLX (respectivamente), por 30 min a 4°C, lavada com 1 ml de água destilada e aplicado o sistema adesivo de forma semelhante ao grupo 3. Em seguida, os espécimes foram centrifugados para precipitação e extração das proteínas mineralizadas e parcialmente desmineralizadas do pó de dentina, sendo a concentração dessas proteínas determinadas. Elas sofreram eletroforese, com ativação pela solução APMA (p-aminophenylmercuric acetate) e incubadas em solução tampão para zimografia, que analisou as atividades das MMPs. O controle foi incubado em EDTA com inibidor de gelatinases. Adicionalmente 48 molares foram seccionados para exposição da dentina oclusal que foi condicionada com ácido fosfórico 35% e divididos em três grupos (n=18): G1 e G2- pré-tratamento após o condicionamento com CLX 0,2% e 2% respectivamente, por 30 s, secagem e aplicação do sistema adesivo; G3- controle. Os espécimes foram subdivididos (n=9) e submetidos ao teste de microtração imediato e após 2 anos de armazenamento em saliva artificial. A análise zimográfica não mostrou atividade de proteínas na dentina mineralizada, o grupo desmineralizado com ácido fosfórico apresentou formas ativas de MMP-2 e -9, assim como no grupo tratado com SB1XT. No entanto os grupos tratados com CLX 0,2% e 2% apresentaram inibição das MMPs -2 e -9. Quanto a microtração, só houve diferença após 2 anos de armazenamento, com redução em 67% da resistencia adesiva no grupo controle, e apenas 16% no grupo tratado com CLX 0,2% ($32,6 \pm 8,3$ MPa) e 30% tratado com CLX 2% ($28,5 \pm 7,2$ MPa), revelando a efetiva ação inibitória das MMPs pela CLX.

Ricci et al. (2010) avaliaram a estabilidade mecânica da interface adesiva resina-dentina realizada *in vivo* na presença de clorexidina. Crianças com pelo menos um par de molares decíduos bilaterais com lesões cariosas oclusais, foram incluídas no estudo. Após a prepara-

ção da cavidade e aplicação do ácido fosfórico, a dentina foi tratada com 5 microlitros de clorexidina 2% (grupo experimental) ou água deionizada (grupo controle). Treze pares de dentes foram restaurados e foram coletadas após a esfoliação fisiológica. Os períodos em função oral após a restauração foram divididos da seguinte forma: até 30 dias, e 1-5, 10-12 e 18-20 meses. Espécimes em forma de palitos com $0,81 \text{ milímetros}^2$ foram obtidos e submetidos a testes de microtração. Uma redução significativa da resistência adesiva foi observada no grupo controle a partir do período de 1-5 meses (30,6%), entretanto no grupo experimental, esta diminuição começou apenas 10-12 meses após o período de função (26,3%). Os autores concluíram que o uso da clorexidina como coadjuvante na adesão dentinária não produziu qualquer efeito deletério para a resistência adesiva imediata e foi capaz de reduzir a taxa de degradação da camada híbrida, nos primeiros meses após a restauração.

Osório et al. (2011). As Metaloproteínases da matriz dentinária (MMPs) estão envolvidas na degradação do colágeno da interface adesiva. Este estudo avaliou se a degradação do colágeno pode ser diminuída com a aplicação da clorexidina (CHX), após diferentes protocolos de desmineralização da dentina. Dez terceiros molares hígidos foram extraídos e armazenados por uma semana. Um Disco de dentina ($0,75 \pm 0,08 \text{ mm}$ de espessura), foi obtido a partir da porção central de cada coroa. Quatro fatias de dentina ($0,75 \text{ mm} \times 0,75 \text{ mm} \times 5,0 \text{ mm}$) foram obtidas a partir de cada disco, assim, 40 fatias de dentina estavam disponíveis. A desmineralização da dentina foi realizada com ácido fosfórico (PA), EDTA ou monómeros ácidos (Clearfil SE Bond e Xeno V). As amostras foram armazenadas (por 24 h, 1 e 3 semanas), na presença ou ausência de CHX. Em metade dos grupos, MMP-2 ativa foi incorporada na solução de armazenamento. No final de cada período de armazenamento, a quantidade de colágeno do Tipo I foi verificada pelo ensaio imunoenzimático tipo I. Os resultados mostraram que a degradação do colágeno foi maior no grupo PA e EDTA. A clorexidina

reduziu a degradação do colágeno nestes grupos apenas por 24 h. Quando a dentina foi desmineralizada com Clearfil SE Bond ou V Xeno, a degradação do colágeno foi reduzida em até 30%, mas a adição de MMP-2 exógena aumentou a degradação do colágeno. Nestes mesmo grupos, o efeito inibitório da CHX nas MMPs, durou até 3 semanas. Os autores concluíram que a CHX possui efeito inibidor da atividade de MMPs. A degradação do colágeno por MMPs é menor na dentina tratada por adesivos autocondicionantes, pois a infiltração de monômero pode exercer proteção ao colágeno desmineralizado, provavelmente através da imobilização de MMPs.

Kim et al. (2011) realizaram um estudo com objetivo de avaliar a influência de diferentes concentrações de clorexidina (CHX) no processo de remineralização e desmineralização da dentina. Blocos de dentina (2 mm x 7 mm x 0,9 mm) foram desmineralizados em solução 0,2 M de ácido fórmico. Quantidade de CHX foi mensurada num espectrofotômetro e em seguida os blocos de dentina foram embebidos em soluções de CHX 0,02%, 0,2%, 2%, durante 1 min. A mudança no módulo de elasticidade dos blocos de dentina armazenada foi medida inicialmente, 2, 4, e 6 semanas após o armazenamento. Os aspectos micromorfológicos das amostras foram observadas no MEV, depois de 6 semanas de armazenamento. O grupo tratado com a concentração mais elevada de CHX reduziu o módulo de elasticidade em 2 semanas e um maior aumento foi verificado em 4 a 6 semanas. Amostras de dentina com a CHX 0,2% e 2%, depositaram maior quantidade de minerais granulares ao longo das fibras colágenas em comparação com o grupo 0,02% CHX. A aplicação de 0,2% a 2% CHX, pareceu ser eficaz em promover a remineralização da dentina desmineralizada.

Stanislawczuk et al. (2011) avaliaram o efeito do gel de ácido fosfórico contendo CLX 2% e da solução aquosa de CLX 2%, na resistência adesiva imediata e após 2 anos, de dois tipos de sistemas adesivos convencionais. Quarenta e dois terceiros molares tiveram a superfí-

cie dentinária exposta. Nos grupos controle as superfícies foram condicionadas com ácido fosfórico, sem CLX, lavadas, secas e reidratadas com água, e aplicados os sistemas adesivos Single Bond 2 (SB) e Prime&Bond (PB). Nos grupos condicionados com ácido fosfórico com CLX, os adesivos foram aplicados da mesma forma que no grupo controle. Nos grupos CLX, a reidratação após condicionamento ácido, foi feita com CLX 2% por 60 s. Após os tempos de armazenamento em água destilada os espécimes foram submetidos ao teste de microtração e os tipos de fratura classificados em coesiva, adesiva ou mista. Após 2 anos, houve uma redução significativa nos valores de resistencia adesiva nos grupos controles ($p < 0,05$), enquanto tanto nos grupos condicionados com ácido fosfórico com CLX 2%, e nos reidratados com CLX 2% a interface adesiva permaneceu estável. Os autores do estudo concluíram que a adição de CLX pode aumentar a durabilidade das restaurações adesivas por estabilizar as fibras colágenas da camada híbrida.

Em 2012 Lafuente avaliou o efeito da aplicação de CLX 2% na camada híbrida usando adesivos convencionais e auto-condicionantes em dentes humanos, após armazenamento em água. Foram realizados preparos cavitário do tipo MO e OD com 1,0 mm de parede de esmalte separando-as em 6 molares e 6 premolares. Os grupos experimentais foram: G1- as cavidades mesiais foram condicionadas com ácido fosfórico 37%, aplicação do sistema adesivo- Adper Single Bond 2 (SB2): e restauração adesiva; G2- nas cavidades distais foi aplicado CLX 2% por 30 s, após condicionamento ácido e remoção do excesso antes da aplicação do adesivo - Adper SE Plus. Todos os espécimes foram seccionados mesio-distalmente e armazenados em água por 125 dias a 37 °C. Após o período de armazenamento, os espécimes tiveram sua interface adesiva analisadas em MEV em duas variáveis: imagem clara da camada híbrida em pelo menos 75% da extensão da interface adesiva, e presença de tags resinosos nos túbulos dentinários. Os espécimes tratados com CLX apresentaram uma camada híbrida mais espessa. O sistema adesivo

SB2 apresentou uma camada híbrida mais homogênea que o SEP. Ambos os sistemas adesivos não tratados com CLX, apresentaram uma camada híbrida com falhas ao longo da interface em metade das amostras. Em 3 das amostras SB2 não tratados com CLX não apresentavam *tags* resinosos ou estes eram muito pequenos, o que não ocorreu com os espécimes tratados com CLX. Os autores concluíram que o uso da CLX 2%, antes da aplicação do sistema adesivo, reduziu a degradação da camada híbrida quando armazenados em água, mas sem influenciar na formação dos *tags* resinosos nos túbulos dentinários.

Kato et al. (2012) avaliaram se a redução da degradação da matriz orgânica desmineralizada (DOM) pelo tratamento com os inibidores da protease (PI) com a hipótese de a clorexidina ser eficaz contra a perda da matriz orgânica da dentina. Fatias de dentina foram desmineralizadas com ácido cítrico 0,87 M, pH 2,3, por 36 h. Na sequência, as amostras foram tratadas ou não, durante 1 min com géis contendo 3-epigallocatequina galato (EGCG, 400 µM), clorexidina (CLX, 0,012%), FeSO₄ (1 mM), NaF (1,23 %), ou nenhum composto ativo (P, placebo). As amostras foram então armazenadas em saliva artificial (5 dias, 37 °C) com adição de collagenase (*Clostridium histolyticum*, 100 U / mL). Foi avaliado por ensaio de hidroxiprolina (HYP) a degradação do colágeno (n= 5), e avaliaram a perda da matriz de dentina por perfilometria (n= 12). Os resultados demonstraram que o tratamento com o gel contendo CLX, reduziu a degradação do colágeno e também a perda da matriz orgânica dentinária. Os resultados deste estudo sugerem que a clorexidina é capaz de prevenir a erosão dentinária devido à sua capacidade de reduzir a degradação da matriz orgânica desmineralizada.

2.2.2 Ácido hialurônico

Campo et al., em 2004, realizaram uma pesquisa com objetivo de avaliar os efeitos antioxidantes do HA no tratamento fibrose hepática. A fibrose hepática envolve interação com vários fatores, incluindo espécies reativas ao oxigênio. Os glicosaminoglicanos (GAGs) que incluem o ácido hialurônico (HA) e condroitina-4-sulfato (C4S) possuem propriedades antioxidantes. Terapia com HA (25 mg/kg) foram administradas diariamente durante 6 semanas. Os dados obtidos mostraram que essas moléculas foram capazes de limitar a lesão hepática crônica e fibrose hepática através do HA exercer mecanismo antioxidante.

Liao et al., em 2005, relataram que o HA possui a capacidade de estabilizar as estruturas e de absorver choques. Atua como mediador de funções fisiológicas através da interação com proteínas de ligação e como receptores celular incluindo a morfogênese, a regeneração, cicatrização e invasão de tumor. A natureza única viscoelástica do ácido hialurônico, juntamente com sua biocompatibilidade levou à sua utilização em vários tipos de cosméticos, e em aplicações médicas e farmacêuticas.

Halicka et al., em 2009, observaram que o ácido hialurônico protege o DNA das células dos danos causados pelos oxidantes endógeno e exógeno e também é capaz de atenuar o processo inflamatório.

Mendes et al. (2008) avaliaram os efeitos do ácido hialurônico (AH) no processo de cicatrização óssea em dentes recém extraídos. Imediatamente após a extração dos molares superiores de ratos, os alveolos da hemi arcada direita foi tratada com gel de 1% AH (aproximadamente 0,1 ml), enquanto que os alveolos esquerdos foram utilizados como controle (coágulo sanguíneo). Os animais foram sacrificados 2, 7 e 21 dias após e foi realizada a análise histológica e morfométrica dos terços apical e médio. A análise histológica mostrou que o tratamento com AH induziu a deposição óssea resultando em uma

matriz óssea mais organizado, aos 7 e 21 dias após a extração do dente. Além disso, o AH aumentou a quantidade de osso trabecular nos 7 e 21 dias após a extração dos dentes (osso trabecular de 7 dias: 13,21 (HY); 2,58 (controle). Os autores concluíram que o AH acelera o processo de cicatrização em alveolos de dentes extraídos de ratos pois estimulam a expressão de proteínas osteogênicas.

Mendes et al. (2010) verificaram em seu estudo a possibilidade do ácido hialurônico (AH) acelerar o reparo de defeitos ósseos. No entanto, a estabilidade de formulações de AH fraco em ambientes aquosos tem dificultado a sua vasta utilização com isso a hipótese deste estudo era se a adição de nanotubos de carbono (SWCNT) em AH (HY-SWCNT) resultaria em um hidrogel reforçado com uma maior estabilidade. Para isso ratos foram submetidos a extração dos molares e os alvéolos foram tratados com SWCNT (50-400 ug / mL) + 1% de AH, ou carbopol (veículo). Depois de sete dias após a cirurgia, as análises histológica e morfométrica foram realizadas para avaliar a formação de osso trabecular. A expressão de colágeno tipo I e III foi determinada por imuno-histoquímica. Os autores observaram que o tratamento com SWCNT não alterou a deposição óssea. Em contraste, a adição de ácido hialurônico 1% induziu um aumento acentuado na formação de osso (AH: $10,10 \pm 1,99\%$; controle: $3,69 \pm 1,17\%$). Além disso, o colágeno tipo I aumentou com o tratamento com o AH.

Bogovic et al., em 2011, investigaram os efeitos do ácido hialurônico na proliferação dos odontoblastos e fibroblastos e a possibilidade de utilizá-lo como capeamento pulpar direto, comparando com hidróxido de cálcio e adesivo dentinário. Após o sacrifício dos ratos, os dentes foram imediatamente extraídos e seccionados transversalmente através da polpa. Os cortes foram colocados em meio de cultura com células de soro bovino fetal a 10%. Durante duas semanas os espécimes foram tratados com ácido hialurônico, hidróxido de cálcio e adesivo dentinário. A celularidade e a viabilidade dos fibroblastos e odontoblastos fo-

ram analisados utilizando um hemocítmetro. Em comparação com o grupo controle o número de células e a viabilidade de fibroblastos e odontoblastos foi maior na cultura tratada com ácido hialurônico. Em contraste o número de células necrosadas foi menor também nesta cultura. Na análise de viabilidade mostrou também ser menos tóxico e mais biocompatível com a polpa do que o adesivo dentinário e o hidróxido de cálcio. Os resultados deste estudo demonstraram alta eficiência terapêutica no tratamento de capeamento pulpar utilizando ácido hialurônico.

Li et al. (2012), investigaram revestimentos com adição de ácido hialurônico a 1% (AH) para melhorar a biocompatibilidade de ligamentos artificiais de polietileno tereftalato (PET). Os resultados deste estudos *in vitro* demonstraram que o AH aumentou significativamente a adesão celular, facilitou o crescimento celular, e suprimiu a expressão de genes relacionados com a inflamação em relação a um enxerto controle. *In vivo* os resultados experimentais em animais mostraram que este o HA inibiu significativamente a infiltração de células inflamatórias e promoveu a regeneração de um novo tecido. Além disso, a formação de colágeno do tipo I no grupo que utilizou AH foi muito maior do que no grupo de controle.

2.2.3 Vitamina C

A vitamina C ou ácido ascórbico (AA) é classificada como vitamina hidrossolúvel e termolábil, destruída por temperaturas altas por um período prolongado. Os seres humanos são incapazes de sintetizar o AA, devido à ausência da enzima gulonolactona oxidase, capaz de realizar esta síntese a partir da glicose (Nelson D and Cox M 2000). O ácido ascórbico encontra-se predominantemente na sua forma ionizada, o ascorbato (C_6H_8O) Atua como um antioxidante, sendo usado para transfor-

mar os radicais livres de oxigênio em formas inertes (Welch et al., 1995) e é essencial para a formação das fibras colágenas existentes em praticamente todos os tecidos do corpo humano, incluindo a dentina.

O AA é co-fator para duas enzimas férricas essenciais na biossíntese do colágeno, a lisil e prolil hidroxilases (Pinnel et al., 1987). Atua na prevenção da oxidação do ferro desta enzima, evitando sua auto-inativação. Estas enzimas catalisam a hidroxilação dos resíduos prolil e lisil nos polipeptídeos precursores do colágeno, e essas modificações pós-translacionais permitem a formação e estabilização do colágeno de tripla hélice, e sua subsequente secreção no espaço extracelular como procolágeno (Pinnel et al., 1987). O procolágeno é então transformado em tropocolágeno, (Chan et al., 1990). Dessa forma o AA promove a síntese de uma trama colágena madura e normal por meio da perfeita manutenção da atividade das enzimas lisil e propil hidroxilases.

Blanck e Peterkofsky (1975) analisaram o estímulo causado pelo ácido ascórbico em fibroblastos, na secreção de colágeno de acordo com o aumento da hidroxilação da prolina, ou seja, pela incorporação da prolina na proteína colágena. A prolina estabiliza a configuração helicoidal do colágeno. A fim de produzir diferentes níveis de hidroxilação, as células foram incubadas com diferentes concentrações de ácido ascórbico. Relataram que o ácido ascórbico estimulou tanto a hidroxilação da prolina no colágeno, como também sua secreção e afirmaram que a secreção de colágeno torna-se diretamente proporcional à hidroxilação da prolina.

Em 1988, Geesin et al., pesquisaram a influência do ácido ascórbico no aumento do nível de mRNA (RNA mensageiro) do Procolágeno do Tipo I e do Tipo III em fibroblastos da pele humana. Em culturas de fibroblastos, a Vitamina C estimula a produção de colágeno, sem qualquer alteração na degradação intracelular do procolágeno recém-sintetizado. Para entender mais sobre este assunto, os autores mediram os níveis mRNA dos procolágeno de tipo I e tipo III em células tratadas

com ascórbico ácido. Observaram um aumento de 3 a 4 vezes na síntese do colágeno, que foi associado a 2 ou 3 vezes o aumento do nível de mRNA, de ambos os tipos de procolágeno. Relataram que estes efeitos estão associados com o controle do ácido ascórbico na translação, ligado ao gene de transcrição do procolágeno ou à degradação do mRNAs.

Nomoto et al. (2006) estudaram o efeito do ácido ascórbico sobre a resistência adesiva à dentina clareada. As superfícies dentinárias de incisivos bovinos foram tratadas por 30 min com peróxido de carbamida a 10%, peróxido de hidrogênio a 30% ou água destilada. Em seguida, foram submetidas à aplicação de ácido ascórbico a 10% por 0, 30, 90 e 180 min. Após o condicionamento com ácido cítrico e restauração com resina composta, os espécimes foram preparados para o teste de microtração e análise em MEV. O clareamento reduziu a força de adesão à dentina e promoveu uma grande oxidação superficial. O ácido ascórbico aumentou a força de adesão proporcionalmente ao tempo de aplicação. Concluiu-se que o ácido ascórbico foi capaz de reverter a força de adesão à dentina, após o clareamento.

Muraguchi et al. (2007), avaliaram a ação do tratamento clareador e do ácido ascórbico (AA) sobre a resistência adesiva (RA). Todos os grupos, com exceção do controle, receberam aplicação do AA após o procedimento clareador. A RA teve seus valores reduzidos após o clareamento porém restabelecida com a aplicação do AA. Com isso, os autores concluíram que o ácido ascórbico foi capaz de reverter a RA reduzida após o tratamento clareador.

Turkun et al. (2009) avaliaram a influência de diferentes concentrações (2,5%, 5% e 10%) do AA em gel, sobre a RA ao esmalte que recebeu tratamento clareador com peróxido de carbamida a 10%. Neste estudo os autores observaram que a aplicação do gel AA a 10% a resistência adesiva do esmalte clareado foi superior quando comparada com o grupo que não recebeu o tratamento com AA. A concentração de

10% AA foi a mais efetiva para restabelecer a adesão após o clareamento.

Kimyai et al. (2010) investigaram o efeito do ascorbato de sódio em gel ou solução, em dois periodos de tempo de aplicação, na resistência adesiva ao esmalte clareado com peróxido de carbamida. Para isso, 72 premolares foram divididos em 6 grupo (n= 12) um controle e cinco experimentais, que receberam o tratamento clareador com peróxido de carbamida. O grupo dois foi realizado o procedimento adesivo imediatamente após o clareamento. O grupo 3 e 4 foram clareados e em seguida tratados com solução de AA por 10 min e 3 h, respectivamente, e então foi realizado o procedimento adesivo. Nos grupos 5 e 6 o AA em gel foi aplicado da mesma forma que no grupo 3 e 4. Os resultados deste estudo revelaram que não houve diferença estatística entre o gel e a solução do AA, também verificarm que a resistência adesiva diminui após o tratamento clareador e que a resistência adesiva somente foi restabelecida com a aplicação de 3 h da solução ou gel AA após o clareamento com peróxido de carbamida.

Soeno et al. (2008) investigaram a eficácia de um condicionador de dentina experimental consistindo de ácido ascórbico (AA) e cloreto férrico (Fe), em termos de resistência adesiva, a hipótese deste estudo era que o ácido ascorbico agiria como agente antioxidante, facilitando a polimerização dos adesivos, resultando em melhora da resistência adesiva. Cinco soluções experimentais foram preparadas e avaliadas: G1 - 10% de AA e 5% de Fe (10AA-5Fe), G2 - 10% de AA e Fe 0% (10AA-0Fe); G3 - 0% de AA e 5% de Fe (0AA-5Fe); G4 - 10% de ácido cítrico e 3% de cloreto férrico (10-3), e, G5 - 0% de AA e Fe 0% (0AA-0Fe). Foram utilizados 20 terceiros molares que tiveram a superfície oclusal removida. As superfícies dentinarias foram tratadas com cada uma das soluções experimentais e posteriormente realizados os testes de microtração. Os melhores resultados de resistência adesiva foram obtidos no grupo que foi tratado com ácido ascorbico 10% e 5% de cloreto férrico.

Celik et al. (2010) realizaram um estudo para avaliar os efeitos do ácido ascorbico na resistência de união de diferentes sistemas adesivos, à dentina tratada com hipoclorito de sódio. Oitenta dentes molares extraídos foram utilizados no estudo. As superfícies vestibulares de esmalte foram removida para se obter uma superfície plana na dentina. Os dentes foram inseridos em resina autopolimerizável e as superfícies de dentina foram irrigadas com NaOCl por 10 min. Metade das amostras foi tratada com ácido ascórbico, durante 10 min. Os dentes foram aleatoriamente divididos em quatro subgrupos de acordo com os sistemas adesivos utilizados (Clearfil SE Bond, Clearfil Tri-S Bond, Adper Prompt-L-Pop, Adper Single Bond 2). A resistência adesiva foi determinada com uma máquina universal de ensaios, a uma velocidade de 0,5 mm / min. Os dados foram analisados estatisticamente através d teste ANOVA a dois fatores, com nível de significância de 0,05. Os resultados obtidos revelaram que o efeito da aplicação de ácido ascorbico na resistência de união de sistemas adesivos, à dentina tratado com NaOCl, foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Os autores concluíram que a aplicação do ácido ascórbico melhorou a resistência adesiva.

Erhardt et al., em 2011, realizaram um estudo com o objetivo de determinar o papel de um agente antioxidante (ácido ascórbico-AA), quando adicionado a fórmula de dois sistemas adesivo, na degradação da interface adesiva. Para isso, a dentina de 48 molares humanos foi exposta e condicionada, em seguida foram aplicados os seguintes sistemas adesivos de acordo com as recomendações do fabricante: condicionamento total (Single Bond-SB) e um autocondicionante (Clearfil SE Bond-CSE). Em metade dos espécimes de cada grupo foi aplicado o mesmo sistema adesivo, porém com adição em sua fórmula de AA a 10%. Após aplicação dos sistemas adesivos, foi inserida de forma incremental a resina composta, em seguida os espécimes foram seccionados em forma de palitos ($1,0 \text{ mm}^2$), onde foram subdivididos em quatro grupos de acordo com a forma de armazenamento: (1) imersão em água por 24 h, (2)

imersão em água por 1 ano; (3) imersão em água por 4 anos, e (4) sofreu desafio químico (imersão em NaOCl 10% por 5 h). Os espécimes passaram pelo teste de microtração (0,5 mm/min). Os dados obtidos foram analisados pelo teste estatístico de comparação múltipla ANOVA ($p < 0,05$). Os espécimes também foram analisados em MEV. Após 24 h, tanto o grupo SB quanto o CSE apresentaram resultados semelhantes independentemente da incorporação AA. A inclusão de AA na formulação CSE diminuiu a resistência adesiva após um ano de armazenamento, porém se manteve no grupo SB, o mesmo ocorreu após quatro anos. O desafio químico diminuiu a resistência adesiva para ambos os adesivos, mas quando AA foi adicionado no grupo SB, esta redução foi significativamente menor. Os autores concluíram que a inclusão de AA na fórmula dos sistemas adesivos exerce um papel protetor na degradação da interface adesiva, quando adicionado no sistema SB, isso ocorreu devido à ação inibitória das metaloproteinases que o ácido ascórbico possui. Observaram também que a durabilidade da resistência adesiva do sistema adesivo CSE, pode ser comprometida pela adição de ácido ascórbico.

É preconizado não realizar restaurações adesiva imediatamente após os dentes serem clareados sendo necessário período de espera de uma semana. No entanto, o uso de antioxidantes, tais como ácido ascórbico, podem ser úteis para evitar este período de espera. Com isso Mazaheri et al. (2011) investigaram a eficácia do ácido ascórbico 10%, como um agente antioxidante, na resistência de união de esmalte clareado. Os resultados deste estudo mostraram que a aplicação de hidrogel 10% de ácido ascórbico, previamente a restauração, apresentou valores semelhantes à dentes que não receberam clareamento, com relação a resistência adesiva.

2.3 Nanoindentação

Desde o século passado, pesquisadores têm utilizado testes de resistência à dureza para avaliar o efeito de procedimentos capazes de provocar alterações sobre as propriedades mecânicas das estruturas dentárias. Porém, nesta época, os instrumentos utilizados geralmente provocavam uma distorção destrutiva nas superfícies testadas. Com o desenvolvimento de novas técnicas e instrumentais mais adequados, o teste de nanodureza tornou-se um dos mais amplamente empregados na atualidade.

Hodge, em 1936 definiu a dureza como a resistência de um corpo para impedir que outro ocupe o mesmo espaço em um mesmo tempo. Basicamente, para os testes de dureza, é avaliada a resistência da superfície a ser testada à penetração de uma substância mais dura.

As medidas iniciais de dureza eram realizadas com grandes forças e grandes indentadores que provocavam deformações em escala milimétrica no material. Nos ensaios macroscópicos, os testes mais utilizados para a obtenção da dureza são os testes Brinell e Rockwell, na qual o valor da carga aplicada é bastante alto, deixando impressões relativamente grandes.

Em 1900, Brinell divulgou o ensaio de dureza que consiste em aplicar uma força “F” em penetradores esféricos de aço ou metal duro (tungstênio), de diâmetro conhecido “D”, sobre a superfície da amostra, durante um tempo pré-determinado, produzindo uma impressão em formato de calota esférica permanente que possui uma profundidade “h” (ABNT).

Outro teste de dureza macroscópica é de Rockwell criado em 1922, que consiste em penetrar na superfície da amostra um cone de diamante ou indentador esférico de aço endurecido. Nesse método, o ensaio é realizado em etapas, ou seja, primeiro se aplica uma pré-carga,

para garantir um contato firme entre o penetrador e a amostra, e depois se aplica a carga do ensaio propriamente dito. A leitura do grau de dureza é feita diretamente num mostrador acoplado à máquina de ensaio, de acordo com uma escala predeterminada (ABNT).

Para se obter dados na dimensão microscópica, os ensaios utilizam penetradores do tipo Vickers ou Knoop e cargas que variam de 1 gf (0,01 N) e 1000 gf (10 N). O que diferencia estes testes é o tipo de penetrador utilizado. Para visualizar as indentações realizadas nestes ensaios a técnica da microscopia é utilizada.

Em 1925, Smith e Sandland desenvolveram o ensaio de dureza Vickers, que utiliza o penetrador em formato piramidal com uma base quadrada, onde suas faces estão afastadas com um ângulo de 136° .

O equipamento que faz o ensaio Vickers não fornece o valor da área de impressão da pirâmide, mas permite obter, por meio de um microscópio acoplado, as medidas das diagonais “d1” e “d2” formadas pelos vértices opostos da base da pirâmide. Conhecendo as medidas das diagonais e a sua média “d”, é possível calcular a dureza Vickers (ABNT-NBR)

Na técnica de Knoop o penetrador utilizado também é de base piramidal, porém mais alongado que o penetrador Vickers, produzindo assim uma indentação rasa (Mccolm). Este teste é utilizado em materiais frágeis.

Utilizando o teste do tipo Koop, em 1958 Craig e Peyton, avaliaram a dureza da dentina e do esmalte. Os dentes utilizados neste estudo, foram embutidos e seccionados obtendo espécimes de 1 a 2 mm de espessura. Os espécimes foram submetidos ao teste de microdureza utilizando carga de 50 g por 15 s. Os valores obtidos para o esmalte humano e dentina foram de 343 ± 3 KHN e 68 ± 3 KHN, respectivamente.

Ogawa et al., em 1983, investigaram a dureza da camada intermediária entre a dentina saudável e o tecido cariado, chamada camada transparente. Utilizaram cento e cinquenta molares cariados, que

foram seccionados verticalmente no centro da lesão de cárie, resultando em duas metades. As superfícies seccionadas de 36 dentes foram submetidas ao teste de dureza Knoop, aplicando carga de 50 g por 15 s. Em todas as amostras, a dureza aumentou a partir da dentina próxima a câmara pulpar até a camada transparente, em seguida o valor da dureza caiu gradualmente através das camadas transparentes, tornando-se mais baixa do que a dureza da dentina normal próxima à polpa.

Para relacionar dureza com o grau de polimerização da resina, Dewald e Ferracane (1987), compararam diferentes técnicas de avaliar a profundidade de polimerização das resinas fotoativadas. Este estudo foi composto de duas partes. Na primeira parte foi utilizado um molde de alumínio cilíndrico de 5 mm de diâmetro. Para produzir espécime em várias alturas, os cilindros possuíam 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm e 5 mm de espessura. As resinas foram inseridas nestes moldes e sobre estes, foi colocado uma tira matriz de plástico e uma lâmina de vidro contendo uma fina camada de adesivo entre eles, e outra tira matriz cobriu a parte superior do molde. As amostras ($n = 5$) foram então colocadas em uma câmara escura e fotopolimerizadas por 40 s a uma distância de 1 mm. O grau de conversão de carbono de ligações duplas para carbonos de ligação única foi analisado pela Espectroscopia Infravermelha (IR). O grau de conversão da resina na parte inferior do molde é assumido ser proporcional ao nível de conversão do carbono a essa profundidade. A análise IR revelou a porcentagem de carbono de ligação dupla (1640 cm^{-1}) presentes na resina antes e após a polimerização. Na segunda parte do estudo foi avaliada a dureza da resina composta em diferentes profundidades da amostra fotopolimerizada em moldes de alumínio (5 mm de diâmetro x 5 mm de altura). Os moldes foram preenchidos por cada uma das resinas compostas, coberta por uma tira de matriz, e então fotopolimerizadas por 40 s. As amostras ($n = 5$ por composto) foram removidas dos moldes e deixadas em câmara escura por 24 h a 37° para polimerização final. As amostras foram embutidas e seccionadas no seu longo eixo,

onde se obteve duas metades. Após o polimento, cada amostra foi observada por um stereo-microscópio e determinou-se a parte do material não polimerizado, que foi descartado. Então foi medida a dureza do material nas profundidades 1, 2, 3, 4, 5 mm ao longo da superfície. O teste de dureza Knoop foi repetido duas vezes em cada profundidade. Os resultados obtidos foram comparados com o grau de conversão. Desta forma, o grau de conversão para cada resina específica poderia estar associado com a profundidade de polimerização determinada por valores de dureza. Os autores concluíram que com o aumento da profundidade da resina, menor foi o grau de conversão e dureza da resina composta. Assim a dureza Knoop obteve uma boa correlação com grau de conversão.

Entretanto com o passar do tempo, as escalas de medida foram se tornando cada vez menores e os métodos para aplicar e medir forças mais sensíveis, permitindo aplicação de pequenas forças resultando em deformações no material em escala nanométrica, chamando os testes agora de nanoindentação.

Entre os primeiros a aplicar a técnica nanoindentação na odontologia foi Van Meerbeek et al. (1993). Os autores avaliaram a dureza e módulo de Young das sucessivas camadas da interface resina/dentina através da nanoindentação de quatro sistemas adesivos disponíveis comercialmente, na qual dois foram também aplicados diferentes agentes condicionantes. Terceiros molares humanos extraídos foram seccionados em discos de dentina de 1 a 1,5 mm de espessura. Os sistemas adesivos foram aplicados sobre a superfície de acordo com as recomendações dos fabricantes, exceto dois que utilizaram ácido fosfórico por 60s, para aumentar a zona de difusão na interface. Após a polimerização foi aplicada a resina composta de baixa viscosidade. Em seguida as amostras foram seccionadas perpendicularmente a interface adesiva. Para facilitar o teste de nanoindentação da interface os dentes foram embutidos em resina epóxica quimicamente polimerizável e polidos por meio de lixas de 600, 1200 e 4000 de granulação e disco de feltro com suspensões di-

amantadas de 3 e 1 μ . Os resíduos do polimento e pastas foram ultrassonicamente removidas por 5 min cada. Pelo menos dois espécimes foram preparados por grupo. Indentações triangulares foram realizadas dentro de uma pequena área com poucos micrometros de diâmetro com pequenas cargas. A dureza da interface adesiva foi significativamente menor que da dentina inalterada. Um gradiente de módulo de elasticidade foi observado da dentina em direção a camada adesiva. Os autores concluíram que a interface além de fornecer adesão adequada, também possui uma característica elástica e flexibilidade que contribui para conservar esta união. Este estudo demonstrou um grau de elasticidade através da interface, validando assim o conceito de cavidades elásticas.

Kinney et al. (1996), utilizou a nanoindentação para medir o módulo de elasticidade da dentina intertubular e peritubular. Duas fatias de dentina, de aproximadamente 1 mm de espessura foram removidas paralelamente à superfície oclusal de cada dente. Uma foi removida próxima a junção amelo-dentinária e a outra próxima da polpa. A dureza da dentina intertubular não totalmente hidratada não foi dependente da localização e variou de 2,23 a 2,54 GPa. A dureza intertubular foi de 0,49-0,52 GPa perto da junção amelo-dentinário, perto da polpa variou de 0,12-0,18 GPa. O módulo de elasticidade da dentina peritubular foi de 29,8 GPa e na dentina intertubular os valores variaram de 17,7 a 21,1 GPa. Desde então, nanoindentação tornou-se uma técnica comum para a determinação das propriedades mecânicas e características estruturais de tecidos biológicos duros.

Em 2000, Mahoney et al., afirmaram que a informação básica sobre as propriedades mecânicas e os efeitos da carga sobre o tecido duro dental é importante para o desenvolvimento bem sucedido dos materiais dentários. Para isso realizaram um estudo avaliando a dureza e módulo de elasticidade do esmalte e da dentina de molares. Utilizaram primeiros molares decíduos superiores que foram seccionados, fixados em resina e polidos. Trinta indentações foram feitas em esmalte e

dentina usando um indentador Berkovitch, 15 destas nanoindentações estavam sujeitas a uma carga de 50 mN e as outras a uma carga de 150 mN. Um sistema computadorizado automático converteu cada penetração a um gráfico força/profundidade, partir da qual os valores médios para a dureza e módulo de elasticidade foram calculados. O resultado obtido para esmalte tinha uma dureza média de $4,88 \pm 0,35$ GPa enquanto que a dureza da dentina foi de $0,92 \pm 0,11$ GPa. O módulo elástico para o esmalte foi $80,35 \pm 7,71$ GPa e da dentina foi $19,89 \pm 1,92$ GPa. Em geral, a elasticidade da estrutura dental aumentou com o aumento da dureza. Os autores concluíram que a nanoindentação oferece um método simples e reprodutível de medir as propriedades mecânicas básicas de pequenas amostras de esmalte e dentina

Urabe et al. (2000), determinaram as propriedades físicas entre esmalte e dentina na junção amelo/dentinária (JED). A JED é a única interface biológica entre um tecido muito duro (esmalte) e um macio (dentina). O teste de resistência à tração da região JED de dentes humanos e bovinos foram medidos através de um teste de microtração, e a nanodureza e módulo de Young do esmalte profundo e a dentina superficial de dentes humanos foram medidos através de um nanoindentador. A média de ruptura à resistência a tração da região JED de dentes bovinos e humanos foram 47,7 MPa e 51,5 MPa, respectivamente. A nanodureza e módulo de Young da região JED foram de 2,37 GPa e 53,18 GPa respectivamente. Os autores concluíram que a JED apresentaram valores intermediários ao esmalte e dentina.

Utilizando a tecnologia da nanoindentação Marshall et al., em 2001, testaram a hipótese que a zona transparente da dentina cariada não aumenta a dureza (H) e o módulo de elasticidade (E). Oito molares cariados e três não cariados, para controle, foram utilizados. Nos dentes cariados foram realizadas secções com espessura de 1 a 2 mm na região de interesse. As indentações na dentina foram feitas em intervalos a partir da polpa através da camada afetada. Os valores da dentina aumentaram

ligeiramente perto da polpa para a zona transparente ($E\ 20,6 \pm 2,2$ GPa; $H\ 1,0 \pm 0,1$ GPa), em seguida, manteve-se constante ou diminuiu ligeiramente através da dentina transparente ($E\ 18,3$ GPa; $H\ 0,8$ GPa) confirmando a hipótese.

Para diferenciar as pontas utilizadas na nanoindentação, Poolthong et al. (2001) determinaram o módulo de elasticidade (E), dureza (H) da dentina. Três pontas indentadoras esférica com raio de 20, 5 e 1 μm foram utilizados e ciclos parciais de carga/descarga foram repetidos. Cada ciclo forneceu os valores de módulo de elasticidade e de dureza. Os resultados foram comparados com aqueles determinados pelo indentador piramidal convencional (técnica de indentação Berkovitch). Os valores E obtidos com as três pontas esféricas não foram estatisticamente significantes, de acordo com o raio 20 e 5 μm , com valores de 19.5-20.9 GPa e o indentador com raio de 1 μm foi capaz de fornecer E da dentina peritubular (28.0 GPa) e intertubular (14.9 GPa). A média de valores de dureza da ponta Berkovich foi semelhante à média de valores obtidos com a ponta esférica de 5 μm e significamente diferente dos indentadores de 20 e 1 μm .

O tecido mineralizado da dentina intertubular é composto por colágeno e mineral que determina importantes variações locais nas propriedades mecânicas. Tesch et al. (2001) realizaram testes para analisar correlações entre as propriedades mecânicas e densidade, tamanho e cristalinidade das partículas minerais. Imagens a partir da mesma amostra foram coletadas com microespectroscopia de infravermelho por transmissão transformada de Fourier (FTIR-RM), espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), imagem quantitativas de elétrons retroespalhados (qBEI), e Nanoindentação. Dureza e módulo de elasticidade diminuíram na junção esmalte/dentina (JED). Em uma análise de correlação, o teor de minerais e a espessura dos cristais de minerais foram encontrados como os melhores indicadores de dureza.

Schulze et al., em 2005, testaram a hipótese que o sistema autocondicionante (Clearfil SE Bond, CSE) é menos sensível à variação de umidade da superfície do que o sistema adesivo convencional de 2 passos (Single Bond, SB). Dezoito molares livres de cárie foram seccionados horizontalmente obtendo uma fatia de 2,5 mm de espessura da porção média da coroa. Três condições diferentes de umidade de superfície (muito úmida, W; seca, D; visivelmente úmido, N) foram realizadas antes da aplicação do sistema adesivo. Uma secção transversal de cada amostra foi analisada com linhas de nanoindentação perpendicular à interface adesiva. Um conjunto adicional de amostras foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura para verificar a espessura da camada híbrida e determinar se as indentações foram realizadas no interior da camada híbrida. As nanoindentações revelaram diferenças significativas no módulo de elasticidade (E) e dureza (H) para a camada híbrida comparando SBN, $E = 2,7 \pm 1,6$; $H = 0,24 \pm 0,1$ GPa com SBD, $E = 0,9 \pm 0,7$; $H = 0,07 \pm 0,05$ GPa, respectivamente, enquanto CSE não mostraram diferenças entre os grupos. Uma zona desmineralizada abaixo da camada híbrida foi encontrada para SBD. A camada híbrida foi maior para CSED e SBD. Em conclusão, CSE apresentaram nenhuma alteração significativa das propriedades mecânicas da camada híbrida (E, H) em diferentes condições de hidratação, enquanto SB apresentaram diferenças significativas, especialmente após a secagem.

He et al., em 2006, utilizaram a nanoindentação para determinar o módulo de elasticidade do esmalte humano. O módulo de elasticidade e dureza versus profundidade de penetração foi determinado. A partir dos dados, o módulo de elasticidade mostrou dependência da carga. As amostras foram fotografadas com um MEV para investigar os danos superficiais. Utilizando esta técnica, as propriedades mecânicas do esmalte foram investigadas em direções paralelas e perpendiculares aos prismas. Os autores concluíram que o módulo elasticidade do esmalte é

influenciada pelos prismas, e a superfície superior é mais dura e tem maior estresse a resposta e a tensão.

O módulo de elasticidade das resinas foi avaliado por Masouras et al. (2008) que realizaram um estudo para determinar o módulo de Young (E) de uma série de modelos de resina odontológica utilizando a nanoindentação, e para examinar como E é influenciado por diferenças no tamanho e forma das cargas. Foram investigados materiais com diferentes cargas variando nos tamanhos e formas, com um preenchimento volume-fração constantes. Espécimes em forma de disco (12 mm x 2 mm) para cada material, foram embutidos em resina de poliestireno e montados em anel fenílico. Posteriormente foram polidos mecanicamente e testados, em um nanoindentador. Foram utilizados para a análise estatística, ANOVA um-fator e teste Bonferroni com nível de significância $p < 0,05$. Análise de regressão e correlação foram realizadas para determinar possível correlação em módulo de Young e o tamanho da carga. O resultado de E variaram de 9,31 a 12,54 GPa para cargas esféricas e de 14,09 a 17,03 GPa para cargas irregulares. Diferenças estatisticamente significativa foram encontradas entre os grupos. Para os materiais testados com a fração de volume constante, o tamanho da carga das resinas compostas parecia ser um fator de ajuste para a determinação do módulo de Young. Tamanhos maiores de cargas tendem a tornar o material mais rígido. Partículas de carga Irregulares resultaram em maiores valores no módulo de elasticidade.

A literatura tem relatado que a resistência adesiva da dentina é alterada pelo laser. Aizawa et al. (2008) avaliaram a nanodureza da interface entre resina e dentina que foi irradiada pelo laser Er:YAG. Três configurações de laser foram avaliadas no mesmo nível de energia (aproximadamente 1.0W): 100 mJ/pulso-10 pps (100-10), 50 mJ/pulso-20 pps (50-20), and 33 mJ/pulso-30 pps. Doze dentes bovinos foram limpos e seccionados na cervical. A parte coronária foi desgastada com lixas d'água (180-, 400-, e 600 de granulação) para preparar a dentina. Os den-

tes foram aleatoriamente divididos em quatro grupos com três dentes cada. Nove dentes foram irradiados por laser e três não receberam irradiação (Grupo Controle). Na sequência as superfícies da dentina foram condicionadas com solução de ácido cítrico a 10 % + cloreto férrico a 3 % por 15 s, lavadas com água destilada e secas. Posteriormente foi aplicado o sistema adesivo 4-META/MMA-TBB (Super-Bond C&B, Sun Medical). Os espécimes foram armazenados por 24 h à 37 °C, após este período os dentes foram seccionados verticalmente. As superfícies seccionadas foram embutidas em resina acrílica. Após um dia as superfícies foram polidas com lixas d'água com granulação 1200 e finalizadas com pasta de diamante de 0,5 µ de diâmetro. A nanodureza da interface adesiva dos espécimes foi mensurada com o auxílio do nanoindentador (ENT-1100a; Elionix, Tokyo, Japan). As mensurações foram feitas a partir de 40 µm de distância da interface adesiva seguindo em direção a resina. O intervalo de cada indentação foi de 5 µ na vertical, e 10 µm na horizontal ao longo da interface e foram realizadas três linhas de indentação por espécime. A carga teste foi de 100 mgf na velocidade de 0.01 mgf/msec. Os dados obtidos a partir de 9 indentações por linha (3 linhas de indentações X 3 espécime) foram realizados na resina, camada híbrida e dentina e estatisticamente analisadas pelo teste ANOVA um fator e dois fatores e teste de Fisher. Amostras de cada grupo também foram analisadas em MEV para verificar a espessura da camada híbrida. As interfaces resina/adesiva do grupo controle mostraram o menor nível de dureza, o que aumentou gradualmente a partir do topo da camada híbrida em direção a dentina. No grupo controle os valores da dureza foi maior que nos grupos irradiados com laser. Na análise em MEV foi observado no grupo controle três camadas na interface: a camada de adesivo, camada híbrida de 3-5 µm de espessura e a dentina subjacente. No grupo irradiado com laser a interface foi composta por quatro camadas: adesivo, camada híbrida, dentina afetada por laser e dentina subjacente. A camada híbrida e a camada afetada pelo laser apresentaram 5 µm e 15 µm de espessura, respectiva-

mente, e ambas foram claramente visível. Os autores concluíram que a camada híbrida foi afetada pelo laser.

As modificações da superfície de esmalte ocasionadas por bebidas cítricas foram avaliadas por Machado et al. (2008), que analisaram a nanodureza, módulo de elasticidade e rugosidade superficial do esmalte dental humano. O esmalte dental humano foram divididos em 3 grupos de acordo com o tipo de bebida utilizada: bebida gaseificada, suco de laranja e água (controle). A rugosidade superficial foi avaliada utilizando um perfilometro, e a nanodureza e o módulo elasticidade foram registrados por um nanoindentador. O pH das bebidas foi medido antes e após o contato cítrico durante 5 semanas. Os refrigerantes causaram uma diminuição significativa na nanodureza e no módulo elástico. Suco de laranja mostrou uma tendência semelhante, mas, surpreendentemente, tinha menos efeito sobre a dureza, módulo elástico e rugosidade do esmalte do que as bebidas gaseificadas.

Pongprueksa et al., em 2008, avaliaram os módulos elásticos da interface resina/dentina utilizando vários tipos de adesivos. Foram utilizados pré-molares livres de cárie, recém-extraídos. Os dentes foram limpos com pedra pomes e estocados com solução de timol 0,1% a 4°C. Cavidades do tipo classe V foram preparadas na face vestibular utilizando brocas cilíndricas, a margem oclusal ficou em esmalte e a margem gengival no cimento. Os dentes foram distribuídos em 4 grupos de 10 dentes, de acordo com o procedimento restaurador. Grupo 1) ácido fosfórico 35% por 15 s, seguida da aplicação de duas camadas de adesivo (Adper™ Single Bond, 3M EPSE, MN, USA) e aplicação de resina composta (Filtek™ Z250, 3M EPSE, MN, USA) na cavidade. Grupo 2) igual grupo 1, exceto o adesivo (Adper™ Single Bond 2, 3M EpsE, MN, E.U.A.). Grupo 3) o procedimento adesivo foi realizada da mesma forma como descrito anteriormente no Grupo 1. Mas antes da resina composta, foi aplicada uma resina flow (Filtek™ Flow, 3M EpsE, MN, EUA), em seguida, a cavidade foi restaurada com a resina composta como mencionado anterior-

mente no Grupo 1. Grupo 4) Os procedimentos restauradores foram realizados conforme descrito anteriormente no Grupo 3, com exceção do agente adesivo que foi utilizado (Adper[™] Single Bond 2, 3M EpsE, MN, EUA). Em seguida os dentes foram seccionados no sentido vestibulo-lingual embutidos em resina acrílica. Os espécimes foram polidos e anexados ao equipamento de nanodureza (ENT-1100, Elionix, Tóquio, Japão) para medir o módulo de elasticidade, foi utilizada carga de 5000 mgf na dentina, adesivo e resina composta e carga de 1000 mgf na camada híbrida em condição seca. Módulos de elasticidade foram calculados e registrados em MPa por um computador ligado ao equipamento, 30 indentações foram realizadas em cada grupo. Os módulos elásticos foram 25,111 MPa para a dentina; 12.243 MPa para a camada híbrida de Adper[™] Single Bond, 11.765 MPa para a camada híbrida de Adper[™] Single Bond 2; para a camada adesiva do Adper[™] Single Bond foi de 7,595 MPa e 8,430 MPa para Adper[™] Single Bond 2; 13,543 MPa para Filtek[™] Flow e 24.494 MPa para a resina composta Filtek[™] Z250. A análise estatística demonstrou que os módulos elásticos foram significativamente diferentes entre as camadas ($p < 0,05$), exceto entre as camadas híbridas dos adesivos ($p = 1,0$). O módulo de elasticidade da interface resina/dentina, camada híbrida, camada adesiva, foi menor do que a dentina e a resina composta. A aplicação do adesivo flow não aumentou o módulo de elasticidade da camada híbrida, quando comparadas com os outros grupos.

A compreensão das propriedades mecânicas da dentina é muito importante para o diagnóstico clínico e na avaliação dos materiais dentários quando se considera estética e longevidade. Com este objetivo Inoue et al. (2009) investigaram a dureza e módulo de Young da dentina intertubular. Dez dentes bovinos foram utilizados, cada dente foi seccionado em seu longo eixo obtendo fatias do dente com espessura de 3 mm, cada espécime possuía a borda incisal e o ápice da raiz. Em seguida, as fatias foram seccionadas em porção coronária e porção radicular. Cada

porção foi embutida em resina acrílica. A dureza e o módulo de Young da dentina intertubular coronária e radicular foram avaliados através do teste de nanoindentação (DUH-W201, Shimadzu Corp, Kyoto, Japão) que tinha acoplada uma ponta do tipo Berkovich. A temperatura ambiente foi mantida em $26 \pm 0,5$ °C. O penetrador, então se aproximou da amostra a uma velocidade de 1 mN/s. A dureza foi medida utilizando uma força de até 5 mN para criar uma indentação superficial sobre a superfície da amostra. Depois do contato estabelecido, a pressão se manteve constante por 5 s. A média de valores da dureza e módulo de Young foi comparada estatisticamente por ANOVA um fator e teste de Fisher PLSD. A dureza da dentina intertubular coronária foi de $0,81 \pm 0,05$ GPa e da dentina radicular foi de $0,55 \pm 0,02$ GPa. O módulo de elasticidade da dentina intertubular coronária foi de $26,60 \pm 2,19$ GPa e da dentina radicular foi de $20,89 \pm 1,10$ GPa. Os resultados deste estudo revelaram que a dureza e módulo de Young da dentina intertubular coronária foram superiores aos da dentina intertubular radicular. Neste mesmo estudo foram realizados testes de análise elementar que concluiu haver um maior teor de Ca na dentina coronária quando comparado com a dentina radicular. Este resultado confirmou que o conteúdo mineral contribui para propriedade mecânica da dentina.

Higashi et al., em 2009, avaliaram as propriedades mecânicas da interface resina/dentina de adesivos em várias formas de aplicação. Foi utilizado um adesivo à base de água/etanol (Adper Single Bond Plus [PAS]) e um sistema à base acetona (One Step Plus [OPS]), aplicados sob diferentes condições de umidade e métodos de aplicação. Vinte e quatro molares humanos foram utilizados, suas superfícies foram desgastadas até obter uma superfície plana de dentina superficial. O condicionamento ácido da superfície oclusal foi realizado com o respectivo ácido dos diferentes sistemas adesivos. Diferentemente das recomendações dos fabricantes, a superfície foi lavada e seca com jato de ar para colapso das fibras colágenas. Sobre a superfície seca (S) ou reumedecida (U), os

adesivos foram aplicados na forma ativa (AA) e inativa (A). Após a polimerização dos adesivos foi inserida a resina composta de forma incremental. Ao término, os espécimes foram armazenados em água destilada (37°C por 24). Os espécimes foram seccionados perpendicularmente à interface resina-dentina para obtenção de 1,5 mm de espessura, que foram embutidos e polidos antes do teste. No total foram utilizados 3 dentes por condição experimental. Estudos pilotos determinaram os procedimentos adequados e necessários para realização dos ensaios de nanoindentação. Nanoindentações foram feitas em atmosfera e temperatura ambiente (24 °C), utilizando uma ponta do tipo Berkovich, em amostras que foram mantidas secas no momento do teste. Foram mensuradas a dureza (D) e o módulo de elasticidade (E) da resina composta, adesivo, camada híbrida e a dentina. Os valores da D e E (GPa) do sistema adesivo e camada híbrida foram submetidos a uma análise de variância de três fatores e ao teste de comparação múltipla de Tukey (alfa=0,05). A média e desvio padrão dos valores de dureza e módulo de elasticidade da resina composta foram ($1,02 \pm 0,07$) e ($14,94 \pm 0,67$), respectivamente. Na dentina, a dureza foi ($0,69 \pm 0,10$) e o módulo de elasticidade ($17,94 \pm 1,84$). Na camada de adesivo, os maiores valores de dureza ($0,38 \pm 0,06$) e módulo de elasticidade ($6,93 \pm 0,93$) do SB foram obtidos no grupo U. Nesta mesma região, o módulo de elasticidade do OPS ($5,91 \pm 1,12$) foi menor para o grupo AA. Na região da camada híbrida, a dureza de ambos os sistemas adesivos foi maior no grupo AA. No grupo S os maiores valores de dureza ($0,47 \pm 0,24$) e módulo de elasticidade ($10,98 \pm 4,65$) da camada híbrida foram obtidos com o AA. Os autores concluíram que a aplicação ativa de ambos os sistemas adesivos em substrato seco, resultou nos maiores valores de dureza e módulo de elasticidade na região da camada híbrida e a umidade dentinária influenciou positivamente nos valores de dureza e módulo de elasticidade do sistema adesivo Adper Single Bond Plus 2 na região da camada adesiva.

Com o objetivo de conhecer as propriedades da camada híbrida, Hosoya et al. (2010) avaliaram a qualidade da interface da dentina cariada e dentina não cariada de dentes decíduos utilizando adesivo autocondicionante de passo único. Dezesseis dentes (8 cariados e 8 não cariados) foram utilizados. Para os dentes não cariados a superfície oclusal foi desgastada com broca diamantada, a dentina cariada foi evidenciada com detector de cárie (cárie Check) e removida. Foi aplicado sobre a dentina o adesivo autocondicionante de passo único (Bond Force, Tokuyama Dental). A superfície foi restaurada utilizando resina composta de baixa viscosidade (Protect Liner F, Kuraray Medical Inc.). Os dentes foram armazenados em água destilada por 24 h. Os dentes não cariados foram seccionados vestibulo-lingualmente, paralelo ao eixo longitudinal dos dentes e ao longo do centro da superfície oclusal. Os dentes cariados foram também seccionados, os que possuíam cáries oclusais no sentido vestibulo-lingual e mésio-distais nos dentes que possuíam cáries proximais. Em seguida, os espécimes foram armazenadas a 4 °C, com 100% de umidade por 2 - 4 dias até o teste de nanoindentação. Para determinar a dureza (H) e módulo de Young (Y), da interface resina-dentina foi utilizado um equipamento de nanoindentação (ENT-1100A, Elionix Co., Tóquio, Japão) com uma câmara de temperatura de 26 °C. As indentações foram feitas em intervalos de 10 µm ao longo de toda a interface resina/dentina. Amostras similares foram examinadas com SEM/EDX, e TEM para avaliar a microinfiltração. Na comparação dos valores de H e Y entre a dentina interfacial e a dentina mineralizada, nenhuma diferença significativa foi observada na dentina cariada, entretanto, os valores da dentina interfacial foram significativamente inferior em dentina saudável. O valor de H da dentina interfacial do dente não cariado foi significativamente menor que o dente cariado. O teor de Ca na dentina cariada foi significativamente maior que o dente não cariado. Não houve diferença significativa dos valores de Y da dentina interfacial dos dois substratos. Tanto para dentina não cariada e dentina cariada, TEM revelou depósitos de prata na dentina interfa-

cial e camada adesiva. No entanto, o conteúdo Ca e P da camada adesiva em 10 μm acima da superfície da dentina foram os mesmos presentes na dentina interfacial. Os autores concluíram que para ambos os dentes, cariado e não cariado, o Bond Force não diminui a microinfiltração e a dureza foi maior na interface de dentes cariados.

Dos Santos et al., em 2011 avaliaram as propriedades mecânicas, nanodureza (H) e módulo de elasticidade (Er) da interface adesiva que receberam tratamento dentinário. A pouca longevidade das restaurações são geralmente atribuídas à degradação dos componentes da interface dentina/resina. Biomodificação da dentina por meio de agentes bioativos podem melhorar a qualidade e a durabilidade da interface adesiva. As propriedades mecânicas foram avaliadas em 24 h, 3 e 6 meses após o procedimento restaurador. Superfícies da dentina desmineralizada foram biomodificadas com glutaraldeído 5% (GD) ou extrato de semente de 6,5% de uva (GSE) antes da aplicação dos sistemas adesivos e resina composta. As medidas de nanodureza e módulo de elasticidade dos componentes da interface adesiva mostraram um aumento aumentaram a Er e H da dentina após 3 e 6 meses quando comparados com o grupo controle que não recebeu tratamento dentinário. As propriedades mecânicas das camadas adesivas e híbridas diminuíram com o tempo. Com isso os autores concluíram que o tratamento dentinário com GD e GSE podem melhorar as propriedades mecânicas na interface ao longo do tempo contribuindo assim para o aumento da longevidade da interface adesiva.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi analisar “*in vitro*” a influência da Clorexidina, Ácido Hialurônico e Vitamina C, aplicados após o condicionamento ácido da dentina, quanto a união adesiva em dois períodos: 24 h e 6 meses de armazenamento, empregando o teste de microtração; e as propriedades mecânicas da camada híbrida (nanodureza e módulo de elasticidade) pela técnica da nanondentação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais empregados

Os materiais utilizados neste estudo e respectivas características, são apresentados no Quadro 1 e Figura 1.

Quadro 1 - Materiais, composições e fabricantes

Material	Composição	Fabricante
Adpter Single Bond 2	Bis-GMA, HEMA, diuretano dimetacrilato, copolímero do ácido polialcenóico, canforoquinona, água, etanol e glicerol 1.3 dimetacrilato	(3M, St. Paul, MN, USA)
Filtek Z250	Bis-GMA, UDMA, Bis-HEMA, Zircônia/Sílica 60% (0,01 a 3,5 μ m).	(3M, St. Paul, MN, USA)



Figura 1 – A) Sistema adesivo Adper Single Bond; B) Resina composta Filtek Z250.

4.2 Preparo dos espécimes

Para este estudo foram utilizados 96 dentes bovinos recém-extraídos, limpos e armazenados em solução de timol 1% e em freezer à -18 °C / 28 dias. As raízes foram seccionadas com disco de *carbó-rundum* em torno de alta rotação e descartadas. Somente as coroas dentárias foram utilizadas (Figura 2A, 2B, 2C e 2D). Limas endodônticas tipo Kerr foram utilizadas para remoção do tecido pulpar. As câmaras pulpares foram irrigadas com água destilada até a completa remoção dos resíduos, de forma a evitar sua deterioração durante o período de armazenagem dos espécimes.

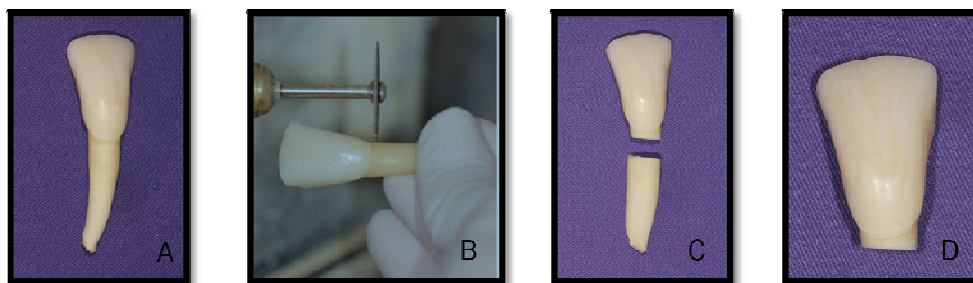


Figura 2 - A) Dente bovino; B) Torno de alta rotação; C) Raiz seccionada; D) Coroa utilizada.

Foram realizados acessos nas faces linguais por meio de uma ponta diamantada esférica (nº 1016HL - KG Sorensen, Barueri-SP, Brasil) na região do cingulo, até a exposição da câmara pulpar, a fim de padronizar a espessura da dentina posteriormente. As superfícies vestibulares foram desgastadas utilizando-se lixas d'água de granulação 80, acopladas a uma politriz circular (DP-10, Panambra, São Paulo-SP, Brasil), sob refrigeração com água, até a exposição de uma área de aproximadamente 6 mm de diâmetro de dentina (Figura 3A, 3B e 3C). A espessura da

dentina remanescente foi padronizada em 2 mm com o auxílio de um espessímetro inserido no acesso lingual previamente realizado. Após a padronização, a abertura lingual e o orifício radicular exposto após a secção da raiz foram obliterados com cera utilidade para evitar a penetração da resina utilizada no processo de inclusão. Em seguida, os dentes foram embutidos em blocos de resina acrílica incolor autopolimerizável (Jet-Artigos Odontológicos Clássico LTDA., São Paulo-SP) imersos em água, para evitar elevação térmica da temperatura da resina por reação exotérmica (Huhtala,1999) e não ocasionar alteração no substrato (Figura 4A, 4B, 4C e 4D).



Figura 3- A) Coroa seccionada; B) Politriz circular; C) Dentina exposta.

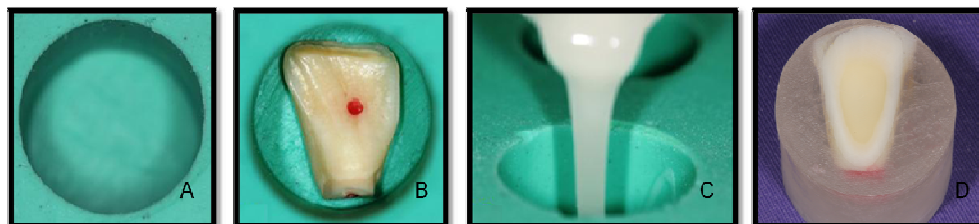


Figura 4- A) Matriz de silicone; B) Coroa posicionada na matriz; C) Resina acrílica; D) Coroa embutida.

4.3 Divisão dos grupos

Noventa e seis corpos-de-provas foram divididos aleatoriamente em oito grupos de 12 espécimes cada (quatro grupos imediato e quatro grupos de armazenamento) para o teste de microtração e o protocolo de tratamento foi o seguinte:

- a) **G1 (Controle):** Condicionamento com gel de ácido fosfórico a 37 % por 15 s (Figura 5A), seguido da lavagem da superfície com água por 30 s. Em seguida, a superfície foi seca com papel absorvente sob suave pressão para remoção do excesso de água. Após o condicionamento ácido o sistema adesivo Single Bond (3M, St. Paul, MN, USA), seguindo as instruções do fabricante foi aplicado de acordo com as orientações do fabricante: aplicação de 2 camadas consecutivas do adesivo, agitação do produto com pincel aplicador (Microbrush International, WI, EUA) por 15 s, secagem suave com jato de ar para evaporação do solvente seguida de fotopolimerização por 10 s (Figura 5C).
- b) **G2 (Grupo experimental com clorexidina):** Condicionamento com gel de ácido fosfórico a 37 % por 15 s, seguido da lavagem da superfície com água por 30 s. Em seguida, a superfície foi seca com papel absorvente sob suave pressão para remoção do excesso de água. Em seguida foi aplicada a solução de clorexidina a 2% por 1 min (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) sobre a área condicionada, na sequência

foi removido o excesso da solução com papel absorvente (Figura 5B). Em seguida o sistema adesivo Single Bond (3M, St. Paul, MN, USA) foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante: aplicação de duas camadas consecutivas do adesivo, agitação do produto com pincel aplicador (Microbrush Interanational, WI, EUA) por 15 s, secagem suave com jato de ar para evaporação do solvente seguida de fotopolimerização por 10 s.

- c) **G3 (Grupo experimental com ácido hialurônico):** Condicionamento com gel de ácido fosfórico a 37 % por 15 s, seguido da lavagem da superfície com água por 30 s. Em seguida, a superfície foi seca com papel absorvente sob suave pressão para remoção do excesso de água. Em seguida foi aplicada a solução de solução de Ácido Hialurônico (AH) 1% por 1 min (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) sobre a área condicionada, na sequência foi removido o excesso da solução com papel absorvente. Em seguida o sistema adesivo Single Bond (3M, St. Paul, MN, USA) foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante: aplicação de duas camadas consecutivas do adesivo, agitação do produto com pincel aplicador (Microbrush Interanational, WI, EUA) por 15 s, secagem suave com jato de ar para evaporação do solvente seguida de fotopolimerização por 10 s.
- d) **G4 (Grupo experimental com vitamina C):** Condicionamento com gel de ácido fosfórico a 37

% por 15 s, seguido da lavagem da superfície com água por 30 s. Em seguida, a superfície foi seca com papel absorvente sob suave pressão para remoção do excesso de água. Em seguida foi aplicada a solução de Vitamina C 10% por 1 min (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) sobre a área condicionada, na sequência foi removido o excesso da solução com papel absorvente. Em seguida o sistema adesivo Single Bond (3M, St. Paul, MN, USA) foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante: aplicação de duas camadas consecutivas do adesivo, agitação do produto com pincel aplicador (Microbrush Interanational, WI, EUA) por 15 s, secagem suave com jato de ar para evaporação do solvente seguida de fotopolimerização por 10 s.

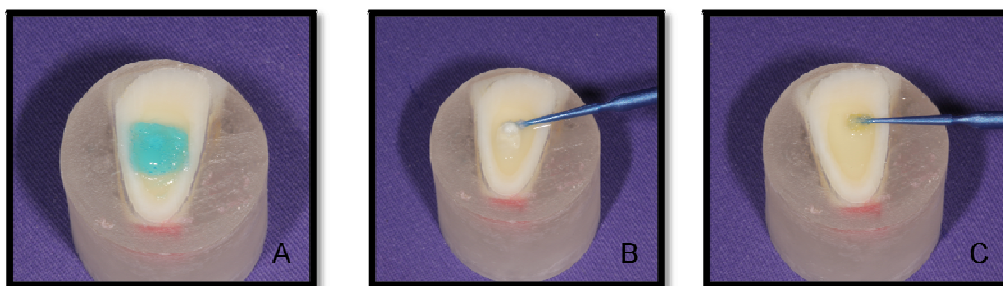


Figura 5 – A) Condicionamento ácido; B) Aplicação da substância experimental; C) Aplicação do sistema adesivo.

Quadro 2 - Divisão dos grupos conforme o tipo de tratamento realizado.

Grupo	Tratamento dentinário
G1 - Grupo Controle	Não recebeu tratamento dentinário com substância bioativa
G2- Grupo Clorexidina	Solução de clorexidina a 2% por 1 min após o condicionamento ácido da dentina
G3 - Grupo Ácido Hialurônico	Solução de AH 1 por 1 min após o condicionamento ácido da dentina
G4 - Grupo Vitamina C	Solução de VC 10% por 1 min após o condicionamento ácido da dentina

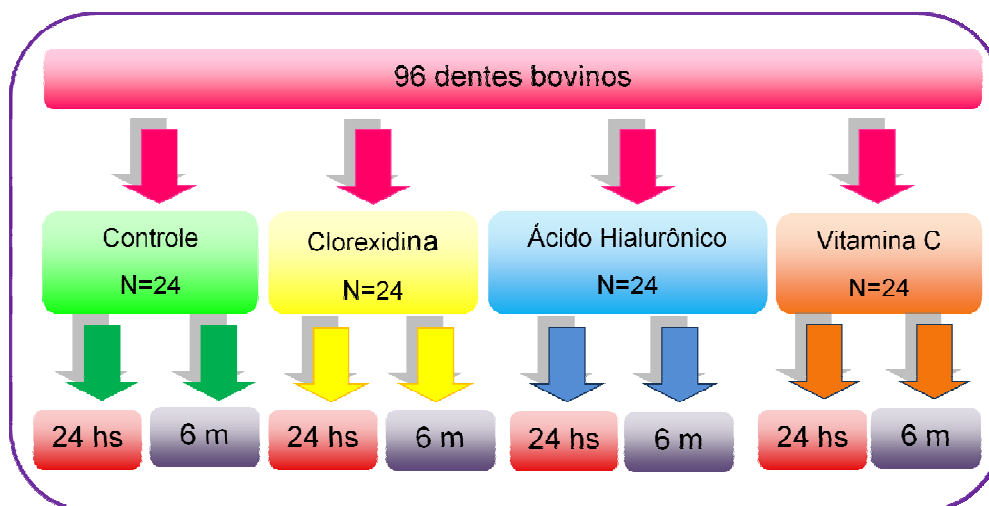


Figura 6 – Esquema representativo da divisão dos grupos.

Em seguida foi aplicada sobre cada um dos espécimes a resina composta Filtek 250 (3M ESPE). A resina foi inserida em incrementos de 2 mm (Figura 4B), com auxílio de uma matriz de silicone com dimensões de 4x4x4 mm (Figura 7A e 7B), e foi realizada a fotopolimerização de cada incremento com aparelho CL-K50 (Kondortech, São Carlos-SP, Brasil) com densidade de potência de 500 mW/cm² por 20 s, de acordo com as recomendações do fabricante. Para complementar a polimeri-

zação da resina, a matriz foi removida e o bloco foi fotopolimerizado por mais 20 s em cada face (Figura 7C). Os espécimes foram armazenados em recipientes fechados com água destilada a 37 °C em estufa bacteriológica.

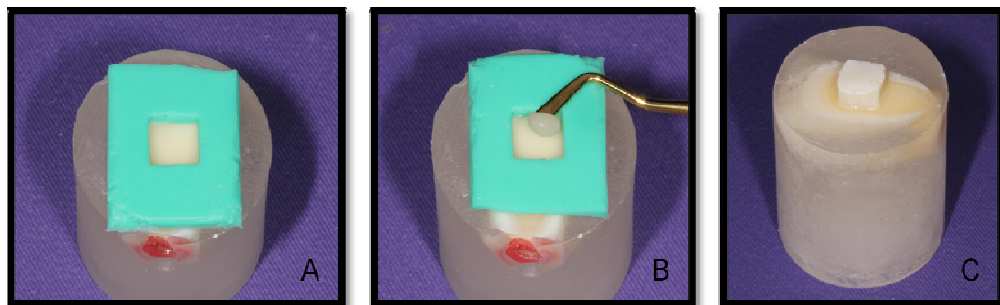


Figura 7 – A) Matriz de silicone; B) Inserção da resina composta; C) Espécime finalizado.

Após 24 h de armazenamento em água destilada, nas amostras dos quatro grupos iniciais foram realizadas secções paralelas ao longo eixo do dente nos sentidos méso-distal e vestibulo-lingual, com espessura aproximada de 1 mm, em uma máquina de cortes seriados Lab-cut 1010 (Extec Technologies Inc., EUA) utilizando-se um disco de diamante em baixa velocidade, sob refrigeração abundante. De cada dente foram obtidos 9 palitos (Figura 8).

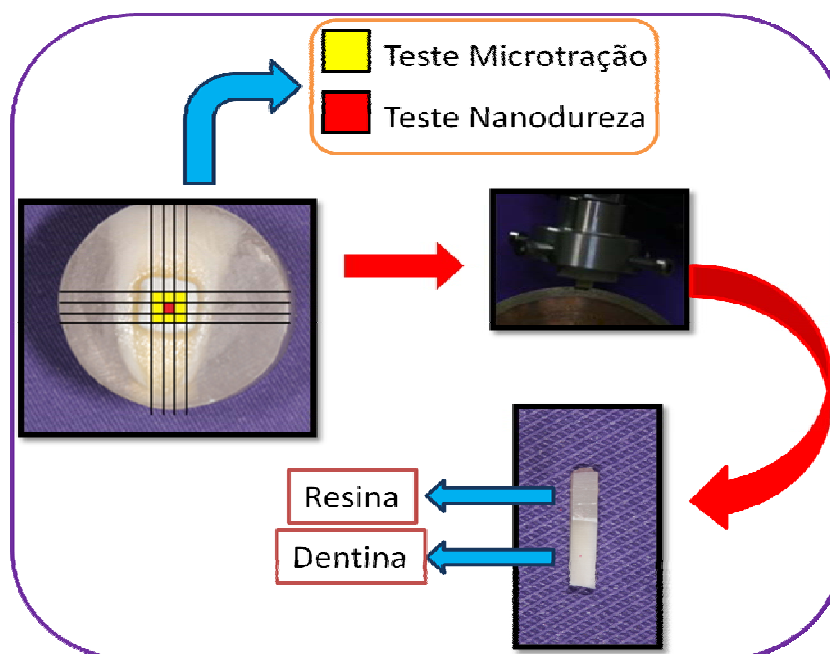


Figura 8 - Confecção dos Palitos.

Os 4 grupos com 6 meses de armazenamento permaneceram em recipientes fechados com água destilada a 37 °C em estufa bacteriológica, sendo realizada troca da água a cada semana. Após este período as amostras foram submetidas aos mesmos procedimentos de secção descritos para o período imediato.

4.4 Teste de microtração

Cada palito foi fixado individualmente em um dispositivo para teste de microtração (Figura 9A), pelas suas extremidades, com um adesivo instantâneo gel a base de cianoacrilato (Loctite 454 gel, Henkel, Itapevi, SP, Brasil), de modo a posicionar a área adesiva perpendicularmente ao longo eixo da força de tração, para realização do ensaio de mi-

crotração na máquina de testes universais EMIC DL-1000 (Equipamentos e Sistemas Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil). Foi utilizada uma célula de carga de 10 Kgf, a uma velocidade de 0,5 mm/min, preconizada pela ISO/TR 11405:1994. No momento da fratura (Figura 8B), o movimento foi interrompido de forma automática, o corpo-de-prova removido da máquina, e os valores referentes à resistência de união à microtração coletados e tabelados para a realização da análise estatística.

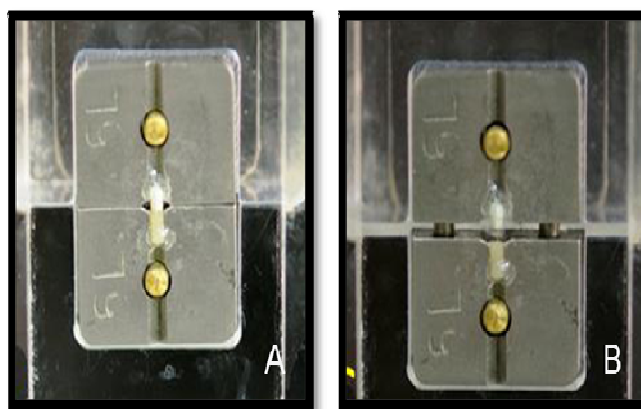


Figura 9- A) Fixação individual do corpo-de-prova no dispositivo para teste de microtração; B) Corpo-de-prova fraturado.

4.5 Análise do padrão de fratura

Os espécimes fraturados foram corados e analisados em estereomicroscópio óptico com um aumento de 20 vezes (Stemi 2000 – Karl Zeiss, Alemanha) para determinação do padrão de fratura. Para tanto os corpos de prova receberam, na superfície da zona de fratura, a aplicação de uma solução corante à base de hematoxilina (Harris; Laboratório Merck), durante 3 min, proposto por (Ohkubo, 1982). A solução não cora a resina composta e o adesivo, evidenciando apenas o material orgânico da

dentina. A seguir os espécimes foram lavados em água e secos com jatos de ar.

Os espécimes foram classificados quanto ao tipo de fratura, conforme proposto por (Hibino et al., 2002; Sengun et al., 2002; Baba et al., 2002) em quatro tipos:

- 1-Adesiva: fratura na interface adesiva;
- 2-Coesiva em resina: fratura na resina;
- 3-Coesiva em dentina: fratura no substrato dentinário;
- 4-Fratura mista: parte da fratura no substrato dentinário e parte na resina.

4.6 Teste de nanoindentação

Foi selecionado um palito dos dentes em que houve menor número de palitos perdidos, sendo assim foram observados 5 dentes de cada grupo que foi armazenado por 6 meses para análise de nanodureza e módulo de elasticidade da camada híbrida. Os palitos foram colados com cola de cianocrilato (Loctite 454, Henkel Ltda., Itapevi, SP, Brasil) em um dispositivo de resina acrílica para facilitar o polimento das amostras. Em seguida as interfaces adesivas foram regularizadas com lixas d'água em granulação sequencial 800, 1000, 1200, 1500, 2000, 2400 e 4000 por 10 s em cada, em Politriz (Dp-10 Panambra Industrial e Técnica AS) a 300 rotações por min (rpm) e refrigeradas à água (Pashley EL et al., 1993; Anido, 2001; Rauscher, 2003). As amostras foram então polidas em disco de feltro com pasta de diamante 1 μ , para obter uma superfície espolhada. Após o polimento todas as amostras foram limpas em ultrassom por 40 min.

A interface de cada amostra foi medida para avaliação das grandezas, dureza e módulo de elasticidade, com auxílio de uma máquina de teste dinâmico de ultra-microdureza (DUH-W211S Co., Tokyo, Japan), do laboratório de dentística da Universidade de São Paulo USP. O teste foi controlado por computador anexo ao aparelho, que fez a análise dos dados. As indentações foram feitas em temperatura 21 °C.

Atualmente, para avaliar as propriedades mecânicas de um determinado material, realizam-se ensaios de indentação. A escolha do tipo de ensaio a ser utilizado na determinação dos valores da dureza e o módulo de elasticidade dependem das dimensões e da composição do material a ser estudado. A carga aplicada e o modo como se obtém a área da indentação é o que diferencia os ensaios. Esta área, A , dependendo da geometria do penetrador e da perspectiva, poderá ser projetada (vista superior da impressão) ou contatada (área interna do material em contato com o penetrador).

Os valores das propriedades mecânicas dos materiais são hoje avaliados com maior acuidade pela técnica da nanoindentação, que fornece dados em escalas nanométricas, em detrimento aos testes macroscópicos (Brinell e Rockwell) e microscópicos (Vickers ou Knoop).

4.6.1 Dureza

A dureza é uma propriedade mecânica definida como uma medida da resistência dos materiais a uma deformação plástica causada pela penetração de uma ponta ou por um risco (Brotzen, 1994).

O modo mais utilizado para a obtenção dos valores de dureza são os ensaios de penetração, onde a área da deformação plástica deixada por uma ponta esférica, piramidal ou cônica ao penetrar no mate-

rial é determinada. A dureza é então definida como a razão entre a carga máxima de penetração e a área medida.

4.6.2 Módulo de Elasticidade

No processo de deformação elástica o material é deformado de uma maneira reversível, ou seja, quando se aplica uma determinada tensão, σ , na superfície do dente, esta é deformada, ϵ , entretanto, quando se retira a força, a superfície retoma sua forma inicial.

A razão entre a tensão que é aplicada e a deformação elástica da superfície do dente é definida como módulo de elasticidade (módulo de Young), e representa o coeficiente angular elástico em um gráfico de tensão X deformação. A figura 10 mostra uma curva típica de tensão X deformação. O regime elástico compreende a deformação inicial até atingir o ponto de escoamento. Ao aumentar a tensão, a deformação aumenta até a fratura. O módulo de elasticidade depende principalmente da composição, estrutura e natureza das ligações químicas entre os elementos.

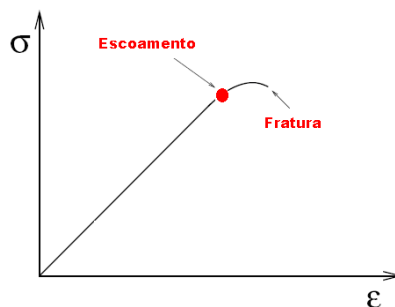


Figura 10 - Curva típica de tensão versus deformação.

4.6.3 Aplicação da Técnica da nanoindentação

A nanoindentação consiste em fazer penetrar uma ponta com geometria conhecida no material, controlando e registrando a carga e profundidade de penetração, a qual é feita em escala nanométrica. A ponta utilizada neste ensaio é de diamante, tipo Berkovich, que possui uma geometria piramidal de três lados, com cada lado formando um ângulo de $65,3^\circ$ com um plano normal à base da pirâmide (Figura 11).

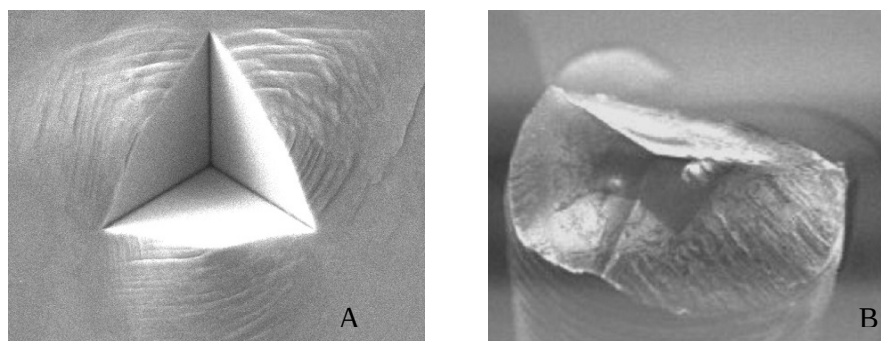


Figura 11 - A) Impressão da indentação; B) Indentador Berkovich*.

Para obter os valores de dureza e módulo de elasticidade, uma força (carga) P é aplicada ao indentador que penetra na superfície da amostra. Os valores da carga utilizada neste estudo foram definidos com base na revisão de literatura e no estudo piloto, sendo padronizado em 1 mN.

As regiões sobre a amostra foram examinadas e selecionadas para indentação utilizando um microscópio óptico (aumento 100X) acoplado ao equipamento. As medições foram realizadas com intervalos de $25\ \mu\text{m}$ ao longo da camada híbrida.

*Fotos cedidas pelo Prof. Dr Carlos Maurício Lepienski Professor Doutor do Departamento de Física, Universidade Federal do Paraná – UFPR, PR, Brasil.

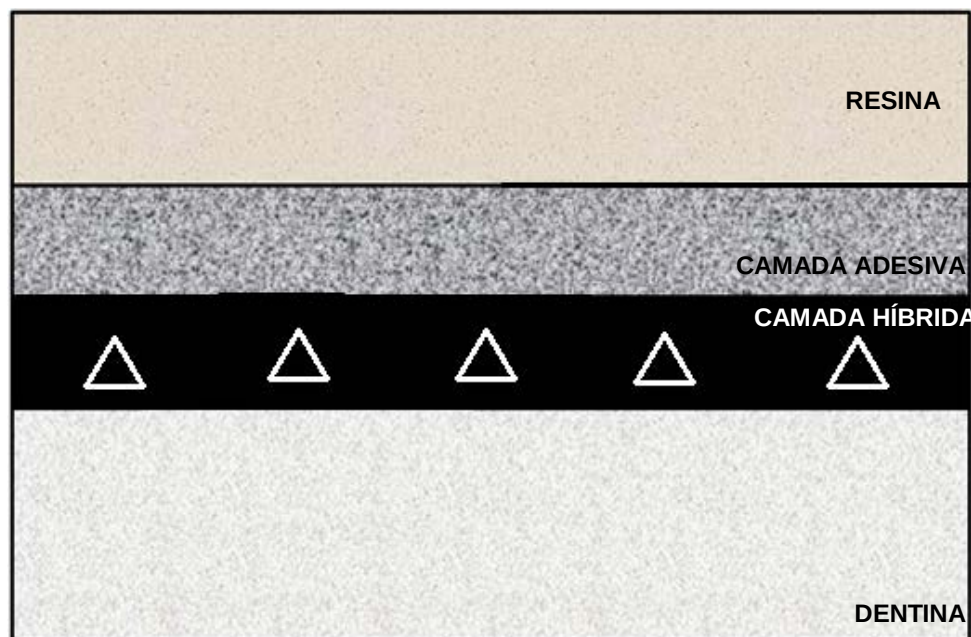


Figura 12 - Pontos de medição para nanoindentação

Esta ponta foi pressionada contra a superfície do dente com a força controlada, enquanto seu deslocamento sobre o dente foi medido. Em seguida foi construída uma curva de força aplicada (P) em função do deslocamento vertical da ponta (h) que foi registrada em função do tempo (Figura 13). A curva de força foi caracterizada por uma região de carga e outra de descarga. Na parte de carga ou carregamento, a ponta entrou em contato com a superfície do dente e a força entre elas foi aumentada gradualmente até o valor máximo de força que foi utilizada no teste (P_{max}). Quando a tensão entre a ponta e a superfície ultrapassou o limite de escoamento, a curva de carga resultou em uma combinação de deformação elástica e plástica do dente. Depois de atingir o valor máximo da força, a ponta começou a retroceder o movimento e a superfície avaliada acompanhou a ponta, até acontecer toda sua recuperação elástica.

Estes dados caracterizaram a curva de descarga ou descarregamento que é a resposta referente à recuperação elástica da superfície.

A velocidade de aproximação do indentador em direção à superfície da amostra é de 30 nm/s. Após o contato, o tempo utilizado tanto para o ciclo de indentação e carregamento quanto para o descarregamento, é de 30 s. Entre o ciclo de carregamento e descarregamento a carga é mantida constante por um período de 5s.

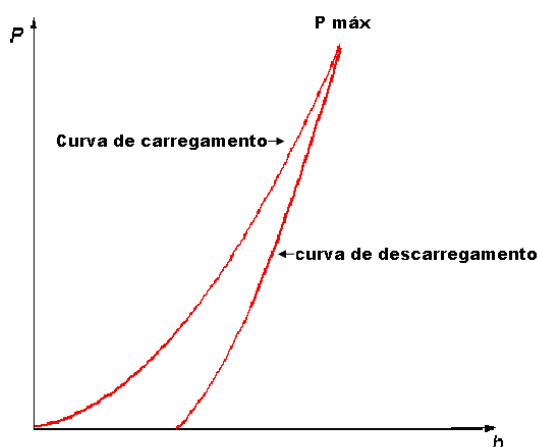


Figura 13- Representação esquemática da curva de carregamento e descarregamento.

A análise dos resultados obtidos foi feita pelo método desenvolvido por Oliver e Pharr, que utiliza a curva de carregamento em função do deslocamento sofrido pelo penetrador, em todo o ciclo do processo de nanoindentação. Esse método é o mais utilizado nos dias de hoje para o estudo das propriedades mecânicas de superfícies, filmes finos e dispositivos que possuem dimensões submicrométricas.

4.6.4 O Método Oliver-Pharr

Oliver e Pharr em 1992 propuseram um método para a obtenção da dureza e módulo de elasticidade, que consiste na interação entre o penetrador e o material indentado através da análise da curva de carregamento e descarregamento. A figura 14 mostra a secção transversal de uma indentação, com o penetrador em contato com a amostra e após a retirada da carga, identificando os parâmetros utilizados nesta análise.

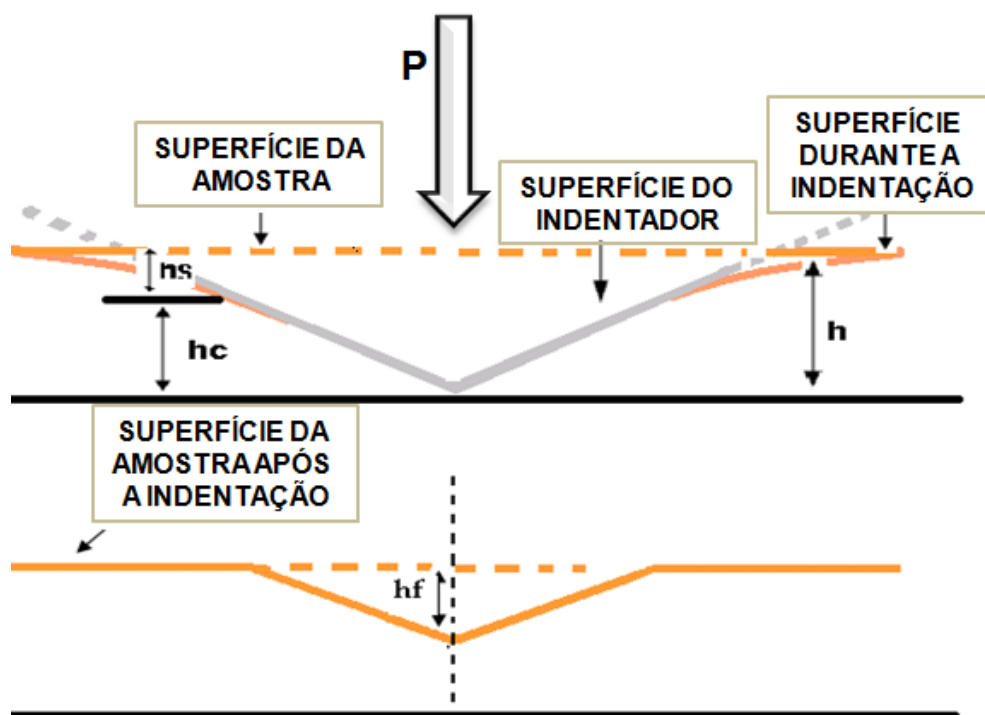


Figura 14 - Perfil da superfície durante o carregamento máximo e após a retirada da carga, num teste de indentação instrumentada.

Em qualquer instante durante o carregamento, o deslocamento total do penetrador (h) é dado por:

$$h = h_c + h_s$$

h_c corresponde à profundidade de contato enquanto h_s corresponde ao deslocamento da superfície no perímetro de contato. Quando o penetrador está totalmente fora da amostra, ocorre recuperação elástica da mesma, obtendo-se a profundidade da impressão DF .

A equação base para as medidas de dureza é:

$$H = \frac{P}{A} \quad (1)$$

A área de contato projetada, A , é calculada avaliando uma função da área determinada numa profundidade de contato h_c , isto é:

$$A = f(h_c) \quad (2)$$

Este cálculo é obtido durante a calibragem da ponta. Para um penetrador Berkovich ideal, tem-se que:

$$A = 24,5h_c^2 \quad (3)$$

Para se obter os valores do módulo de elasticidade neste método, o efeito de indentadores não perfeitamente rígidos, ou seja, as

deformações sofridas por estes, são levados em consideração com a introdução do chamado *módulo elástico reduzido* E_r , definido pela equação:

$$E^* = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{S}{\sqrt{A_p}} \quad (4)$$

A grandeza S , denominada rigidez do material, é obtida a partir da inclinação da porção inicial da curva de descarga. Uma vez conhecido o valor de E_r , o módulo elástico E_s do material analisado será encontrado pela equação:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{(1-\nu^2)}{E} + \frac{(1-\nu_i^2)}{E_i} \quad (5)$$

onde ν e ν_i são, respectivamente, as razões de Poisson (definida como a razão entre as deformações específicas transversal e longitudinal) da amostra e do indentador e E_i é o módulo de Young do indentador. No nosso caso, com uma ponta de diamante, $E_i = 1141$ GPa e $\nu_i = 0,07$.

4.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004), STATISTICA (StatSoft, version 5.5, 2000) e STATISTIX (versão 8.0, 2003, Analytical Software). Após o teste de microtração foram avaliados a partir do modelo estatístico análise de variância (ANOVA) dois fatores e o teste de Tukey, empregando-se nível de significância de 5%; e para o teste de nanoindentação foi empregado o teste ANOVA um fator e o teste de Tukey para comparação entre os grupos (5%).

5 RESULTADOS

Os dados obtidos serão apresentados em duas partes: parte 1-teste de microtração e parte 2- teste de nanoindentação.

Na parte 1, os valores obtidos no teste de microtração serão submetidos à análise estatística descritiva e inferencial e análise de fratura.

Na parte 2, os valores obtidos no teste de nanoindentação será apresentada a análise das propriedades mecânicas, subdividido em nanodureza e módulo de elasticidade da camada híbrida, formada pelos grupos que foram armazenados por 6 meses.

5.1 Teste de microtração

5.1.1 Estatística descritiva

A estatística descritiva consistiu no cálculo das médias e desvios padrão, apresentada na Tabela 1 e 2 de acordo com o período de armazenamento, mostrada a seguir: Com sua representação gráfica, via Gráfico de Colunas, na Figura 15, mostrada a seguir.

Tabela 1 – Análise Descritiva dos dados de microtração (MPa) s as estratégias adesivas obtida no período de 24 h

Condição experimental	Média	DP
G1	26,20	3,59
G2	25,90	1,6
G3	27,44	3,51
G4	22,29	5,18

Tabela 2 – Análise Descritiva dos dados de microtração (MPa) s as estratégias adesivas obtida no período de 6 meses

Condição experimental	Média	DP
G1	17,79	1,10
G2	21,68	1,7
G3	23,36	2,49
G4	18,13	4,64

Na figura 15, observam-se as médias e desvio-padrão evidenciando as diferenças obtidas entre os grupos.

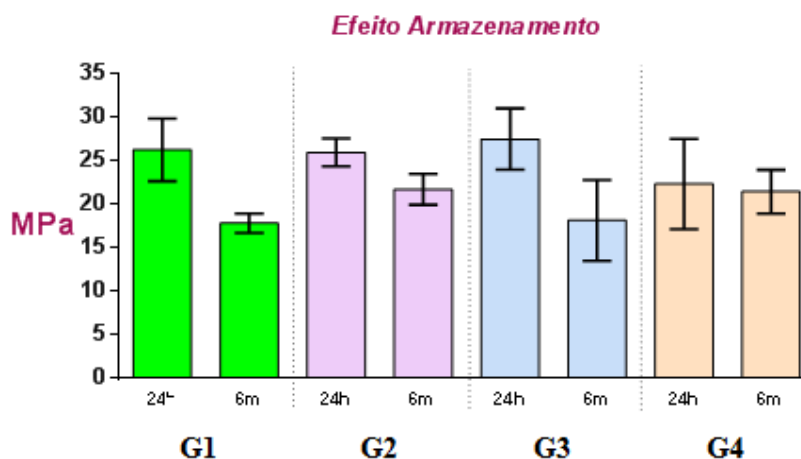


Figura 15 - Gráfico de colunas (média $\pm$ desvio padrão) dos valores da resistência adesiva s as variáveis em estudo (G1: Controle; G2: clorexidna; G3: Ácido hialurônico e G4: Vitamina C).

5.1.2 Estatística Inferencial

Para avaliar a influência dos fatores em estudo: tempo de armazenamento (A) e tratamentos dentinários (TD), os dados obtidos em nosso experimento foram submetidos ao modelo estatístico de análise de variância dois fatores, elemento fixo.

Tabela 3 - Teste de análise de variância (ANOVA) a dois fatores

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
TD	3	362,97	120,991	11,16	0,0001*
A	1	653,18	653,18	60,50	0,0001*
TD*A	3	81,68	27,226	2,51	0,0638
Resíduo	88	954,02	10,841		
Total	95	2051,85			

*p<0,05

Por meio da tabela 3, se pode verificar: (i) o efeito interação apresenta um p-valor próximo ao nível de significância comumente adotado; (ii) os efeitos principais, TD e A, foram estaticamente significantes.

O fato do efeito principal, período de armazenamento, ser estatisticamente significativo indica que a resistência em 6 meses (20,24 MPa) é inferior ao período imediato (25,49 MPa). Pode-se observar, via gráfico de médias, Figura 16, que para todos os níveis do fator TD, os valores de armazenamento de 24 h são superiores ao armazenamento por 6 meses.

Em termos do efeito TD, figura 16, pode-se verificar que em todos os níveis, há uma redução de valores de resistência com o aumento do período de armazenamento. A redução é mais acentuada para o grupo Controle.

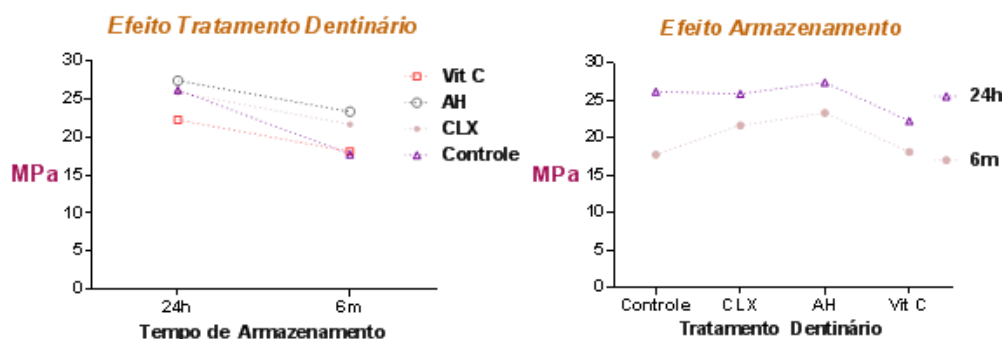


Figura 16 – Gráfico das médias – Ilustração dos efeitos: tratamento dentinário e efeito armazenamento.

Na Figura 17, pode ser observado a porcentagem da redução da resistência adesiva (RA) após 6 meses de armazenamento de cada grupo.

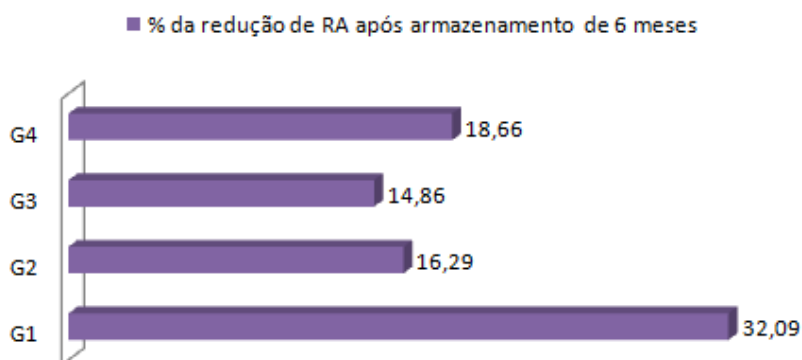


Figura 17 - Gráfico de barras- % da redução de RA dos valores da resistência adesiva após 6 meses de armazenamento (G1: Controle; G2: clorexidna; G3: Ácido hialurônico e G4: Vitamina C).

Foi efetuada uma comparação dos quatro TD em cada período de armazenamento, por meio do teste de Comparação Múltiplas de Tukey (5%), (Tabela 4 e 5)

Para o período de 24 h, o G4 difere dos demais com o menor valor, Tabela 4 mostrada a seguir.

Tabela 4 – Teste de Tukey (5%) para o efeito Tratamento dentinário em 24 h

Tratamento dentinário	Média	Grupo Homogêneo
G3	27,44	A
G1	26,20	A
G2	25,90	A
G4	22,28	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%

Quando avaliamos os grupos após o período de 6 meses de armazenamento, verificamos que os grupos G3 e G2 apresentam semelhança, assim como G4 e G1, com valores médios menores que os anteriormente citados, havendo diferença entre esses e os anteriores, conforme apresentamos na Tabela 5, onde grupos diferentes recebem letras diferentes.

Tabela 5 – Teste de Tukey para o efeito Tratamento dentinário em 6 meses

Tratamento dentinário	Média	Grupo Homogêneo
G3	23,36	A
G2	21,68	A
G4	18,12	B
G1	17,79	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

5.1.3 Análise dos Padrões de fratura

Após a fratura dos espécimes no ensaio de microtração foi realizada a classificação do tipo de fratura em: adesiva, mista e coesiva em dentina e coesiva em resina. Somente os resultados obtidos por fratura adesiva e mista foram considerados, uma vez que se pretendia saber os valores que a união adesiva suportava e nos casos de fratura na dentina ou na resina não se determinava os valores da união adesiva da interface por supor que seriam mais altos.

Tabela 6- Classificação quanto ao tipo de fratura (número de palitos)

Grupo	Total	Fratura Adesiva	Fratura Mista	Fratura Coesiva em dentina ou resina	Palitos Perdidos
G1 24 h	98	42	37	19	10
G2 24 h	96	46	35	15	12
G3 24 h	99	49	37	13	9
G4 24 h	91	44	29	18	17
G1 6 meses	85	41	24	15	23
G2 6 meses	81	42	21	13	27
G3 6 meses	78	49	20	11	23
G4 6 meses	86	40	27	14	22
Total	714	266	310	118	150

Na Figura 18, pode ser observado o padrão de fratura de cada grupo após o teste de microtração, classificado em adesiva, coesiva em resina ou em dentina e mista.

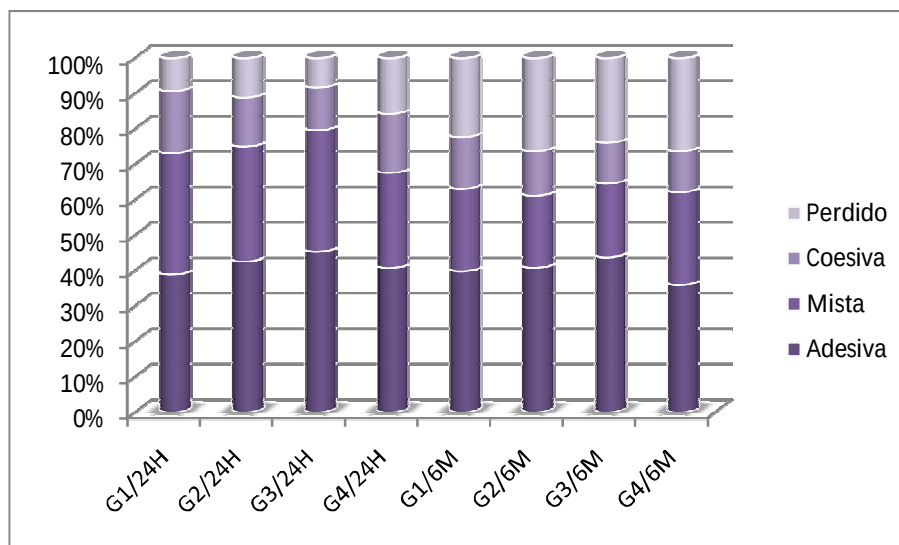


Figura 18 – Gráfico de colunas – classificação do padrão de fratura dos grupos.

5.2 Nanoindentação

5.2.1 Nanodureza

A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvios padrão, apresentada na Figura 19, mostrada a seguir em GPa.

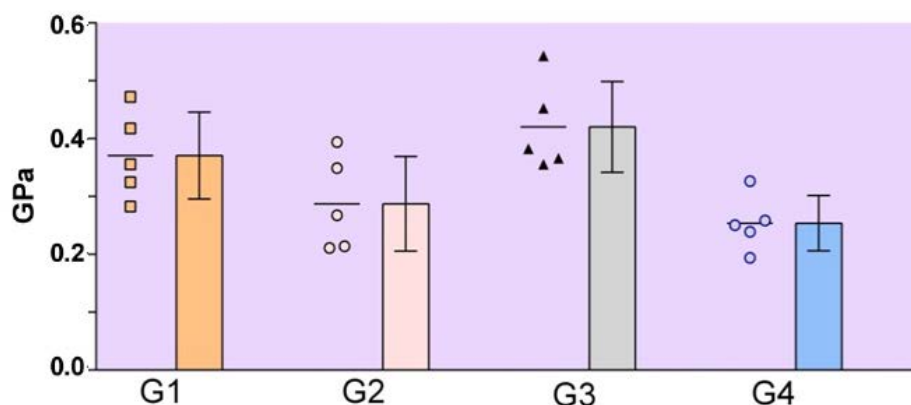


Figura 19 - Gráfico de colunas (média±desvio padrão) dos valores de nanodureza da camada híbrida, obtidos pelos diferentes tipos de tratamento dentinário.

Verifica-se, com as informações acima, que as condições experimentais não apresentam mesma dispersão, valores próximos de desvio-padrão. Para avaliar o relacionamento entre os diferentes tipos de tratamento dentinário os dados obtidos em nosso experimento foram submetidos ao modelo estatístico da análise de variância a um fator, após ser considerada a distribuição dos resíduos. Os valores resíduos, decorrentes do ajuste do modelo adotado, foram examinados para avaliar a adequabilidade do modelo para válidas inferências estatísticas e foi determinado que os dados originais propiciaram um adequado ajuste, seguindo uma distribuição normal de probabilidade e ainda uma uniformidade dos resíduos. Portanto, a estatística inferencial consistiu no teste de análise de variância de (ANOVA) um fator (tratamento dentinário). O nível de significância escolhido foi o valor convencional de 5% ($p < 0,05$) para verificar se existiam diferenças significantes entre os grupos.

Tabela 7 - Teste de análise de variância (ANOVA) a um fator

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
TD	3	867,50	289,166	5,57	0,0082*
Resíduo	16	830,87	51,929		
Total	19	1698,37			

*p<0,05

Quando se aplica o teste ANOVA verifica-se que há diferença estatística entre os grupos avaliados (Tabela 7).

Ao comparar os quatro valores médios das condições experimentais (Tabela 8), por meio do teste de comparação múltipla de Tukey (5%), pode-se verificar que a nanodureza da camada híbrida do G3 (Ácido hialurônico), apresenta maior valor que os demais grupos. Observa-se também que os grupos G2 (Cloroxidina) e G4 (Vitamina C) não diferem do G1 (Controle).

Tabela 8 – Teste de Tukey para o efeito Tratamento dentinário em 6 meses

Tratamento dentinário	Média±DP	Grupo Homogêneo
G3	0,42±0,2	A
G1	0,37±0,16	A B
G2	0,28±0,11	B
G4	0,25±0,28	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%

5.2.2 Módulo de elasticidade

Na Figura 20 podemos observar a distribuição dos valores médios do módulo de elasticidade.

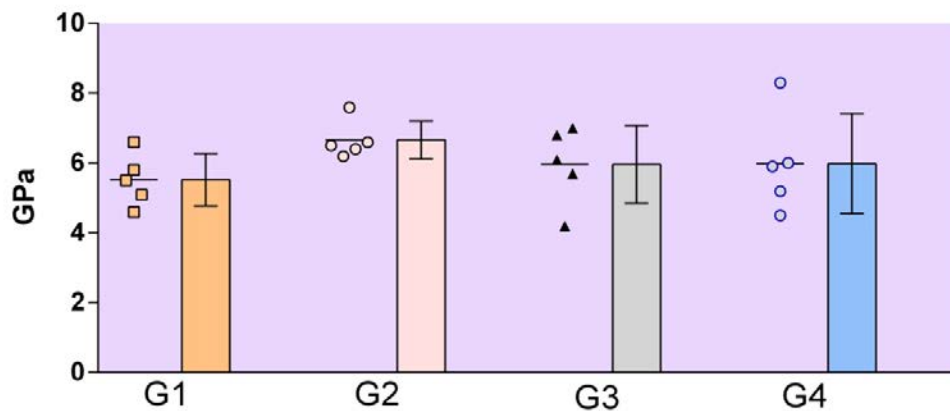


Figura 20 - Gráfico de colunas (média±desvio padrão) dos valores de módulo de elasticidade da camada híbrida, obtidos pelos diferentes tipos de tratamento dentinário.

A Tabela 9 a seguir apresenta o teste de variância a um fator para os diferentes tipos de tratamentos dentinários.

Tabela 9 - Teste de análise de variância (ANOVA) a um fator

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
TD	3	3,22	1,10	1,07	0,3912
Resíduo	16	16,62	1,03		
Total	19	19,94			

*p<0,05

Pelo teste ANOVA, pôde-se aceitar a hipótese de nulidade do efeito tratamento dentinário sobre o módulo de elasticidade da camada híbrida, pois os grupos avaliados não apresentaram diferença estatística significativa.

6 DISCUSSÃO

6.1 Da Metodologia

O sucesso de um procedimento restaurador com resina composta depende da formação de uma camada híbrida de qualidade. É importante salientar que a formação desta camada está relacionada a muitos fatores, dentre eles podemos destacar: a permeabilidade dentinária, os agentes condicionadores, o tempo de condicionamento, a qualidade da dentina, a umidade, o tipo de sistema adesivo, a difusibilidade dos monômeros, a profundidade de polimerização e as características estruturais da rede de fibras colágenas (Pashley DH et al., 1992; Eick et al., 1993; Marshall, 1993; Sano et al., 1995; Tay et al., 2000; Cadenaro et al., 2005; Carvalho et al., 2005).

Atualmente, as pesquisas realizadas nesta área têm demonstrado uma mudança de direcionamento, onde não se limita somente as análises que avaliam a resistência adesiva inicial, mas também avaliando a longevidade de união. Com isso, não só é importante uma alta resistência mecânica, como também uma boa qualidade da interface adesiva que permita uma maior durabilidade da restauração (Manuja et al., 2012). Dessa forma, analisar o comportamento físico-mecânico das restaurações adesivas se torna de grande valia a fim de conhecer o prognóstico restaurador.

Assim, são necessários testes laboratoriais que comprovem a eficiência e qualidade dos materiais. Devido à dificuldade de reproduzir experimento *in vivo*, por motivos éticos, tempo e custo elevado, os

estudos laboratoriais, *in vitro*, são indicados para avaliação inicial desses materiais (Van Meerbeek et al., 2010). No entanto, a padronização e cuidados com as variáveis como o substrato, profundidade da dentina, tempo de estocagem e método de teste, são necessários para obter resultados mais confiáveis, que possam prever o comportamento destes materiais quando aplicados clinicamente.

Com relação ao substrato, a obtenção de dentes humanos para a realização de estudos laboratoriais de materiais e de técnicas odontológicas consiste em uma das maiores barreiras encontradas no âmbito da pesquisa odontológica. Adicionado a isto, são enfrentadas nestas pesquisas dificuldades na padronização destes substratos. Assim, a utilização de dentes bovinos vem como alternativa prática de superar estas interferências. Embora muitas pesquisas alertem para as diferenças entre substrato humano e bovino, recomendando a realização de estudos que comprovem uma inter-relação válida, autores como Anido (2001) e Yassen et al. (2011) validaram em primeira instância a utilização de dentes bovinos como possíveis substitutos de dentes humanos em testes laboratoriais. Baseado nisto, no presente estudo optamos pela utilização de dentes bovinos como substrato de adesão, devido a facilidade de obtenção e possibilidade de padronização dos dentes.

A dentina é um tecido que apresenta um aspecto tubular, com os túbulos dirigidos perpendicularmente à superfície em relação ao plano oclusal, sendo que a quantidade e diâmetros médios variam de acordo com a proximidade do tecido pulpar. Próximo à região da junção amelodentinária, a dentina apresenta cerca de 10.000 túbulos mm^2 , próximo à porção média, cerca de 30.000 túbulos/ mm^2 e, próximo à região da polpa, cerca de 50.000 túbulos/ mm^2 . Em relação aos diâmetros dos túbulos, estes são menores próximos à junção amelodentinária e maiores próximo à região da polpa (Garberoglio, Brännström, 1976). A variação na quantidade e diâmetro dos túbulos influencia diretamente a qualidade da hibridização. Neste estudo, para evitar variações no resultado devido às

mudanças morfológicas do substrato dentário, o remanescente após o preparo foi padronizado em 2 mm e também por se assemelhar nesta profundidade a dentina bovina com a dentina humana (Nakamichi et al., 1993; Anido, 2005).

Para realizar a armazenagem dos espécimes, optamos pelo congelamento em solução de timol 0,1%. A utilização de meios com propriedades bactericidas e bacteriostáticas tem sido também proposta para armazenamento a fim de evitar contaminação dos espécimes (Pongprueksa et al., 2008). Segundo Titley et al. (1998), os dentes devem ser congelados para manter suas características semelhantes aos dentes recém-extraídos. Esses autores apontam, ainda, que alterações *post-mortem* podem ocorrer em dentina, mas que o congelamento dos dentes imediatamente após a extração, pode evitar essas mudanças. Cavalcanti et al. (2009), afirmaram que dentes armazenados em solução de timol 0,1% à temperatura de 4°C não afeta os resultados dos testes para estudo da interface adesiva.

Para facilitar a execução dos procedimentos adesivos e posteriormente o posicionamento no equipamento de microtração e nano-indentação, os espécimes foram embutidos em resina acrílica, o que segundo Takemori et al. (1993), não afeta os resultados do teste.

Com relação à técnica de hibridização da dentina, a utilização de sistemas adesivos para estabelecer a união entre estrutura dentária e resina composta, quando aplicados de forma adequada, visa oferecer um suporte no selamento marginal e na retenção de restaurações com este material reduzindo assim o surgimento de cáries secundárias, de microinfiltração marginal e, conseqüentemente aumentando a longevidade das restaurações. Sabe-se que a restauração adesiva em dentina é mais complexa que quando realizada no esmalte, uma vez que este possui um alto teor mineral, e maior homogeneidade na composição de sua estrutura (Sano et al., 1999). Portanto, em dentina a aplicação de siste-

mas adesivos deve ser meticulosa em função da dificuldade de interação com diferentes estruturas, entre elas o colágeno.

Desde que Buonocore, em 1955, propôs à aplicação de uma solução ácida para aumentar a retenção de materiais resinosos aos tecidos dentários, diversos estudos foram realizados e comprovaram a efetividade desta técnica (Bertolotti, 1991; Fusayama, 1992). Ela se baseia numa desmineralização seletiva dos cristais de hidroxiapatita presentes no esmalte e na dentina dental, resultando numa superfície rugosa e com alta energia de superfície. Estas características proporcionam uma alta capacidade de molhamento quando da aplicação dos monômeros resinosos que, ao se polimerizarem, resultam na formação de prolongamentos que “ancoram” a resina sobre o dente, os quais foram denominados “tags” (Iwaku et al., 1981).

A capacidade de desmineralização do agente condicionador de superfície esta relacionada à sua acidez, a qual é mensurada através de seu pH (Scheffel et al., 2012). Diz-se que uma dada solução tem pH neutro quando o número de cátions H^+ presentes é igual ao número de ânions OH^- , sendo que nesse caso o pH mensurável é igual a 7 (Lehninger et al., 2006). Uma solução é considerada ácida quando o número de íons H^+ é maior que o número de íons OH^- . Portanto, toda substância que em solução aquosa seja capaz de liberar íons H^+ e deslocar o equilíbrio é considerada um ácido (Lehninger et al., 2006). A substância mais empregada em odontologia para este fim é o ácido fosfórico, um ácido inorgânico que é constituído por moléculas com três radicais ionizáveis, sendo assim denominado um triácido. Este é empregado numa concentração de 35 a 37%, devido ao seu alto potencial de ionização, o que resulta num pH final baixo (0,1-0,4). Portanto, devido à alta concentração dos íons H^+ , sua aplicação deve ser rápida, em nosso estudo padronizamos 15 s de ação, onde é capaz de produzir um padrão de condicionamento da dentina satisfatório e sendo amplamente recomendado (Pashley DH et al., 2011; Scheffel et al., 2012).

Optamos nesta pesquisa, pela utilização do sistema adesivo *Adper Single Bond 2* (3M ESPE) por ser um produto amplamente estudado com propriedades bem conhecidas. É composto por HEMA, além de solventes como água e etanol, devido a este fato empregamos a técnica de adesão úmida (Tay et al., 1996). Segundo Carvalho et al., em 2003, os adesivos cujo solvente é água, são menos sensíveis à técnica quando comparados aos que utilizam a acetona, devido à menor variabilidade da resistência adesiva. O sistema *Adper Single Bond 2* requer o condicionamento total prévio da dentina.

Diante do mecanismo pela qual é conseguida a hibridização do sistema adesivo *Adper Single Bond 2*, a presença de água após a lavagem para remoção do ácido, é importante para que o arcabouço colágeno seja mantido em expansão, o que facilita a penetração dos monômeros (Pashley DH et al., 2001). Por isso, optou-se pela remoção do excesso de água, por meio de secagem com papel absorvente e não jato de ar.

Muitos estudos têm mostrado defeitos ao longo da interface adesiva, principalmente em sistemas adesivos que requerem condicionamento ácido prévio, por haver a possibilidade de discrepância entre a região desmineralizada e a penetração do adesivo. Quando isso ocorre, os monômeros resinosos aplicados não impregnaram completamente as fibras colágenas expostas (Sano et al., 1994; Burrow et al., 1996; Uno, Finger, 1996; Toledano et al., 1999). Este colágeno desprotegido pode sofrer hidrólise com o passar do tempo, prejudicando a durabilidade das restaurações (Watanabe et al., 1994; Spencer, Swafford, 1999; Tjäderhane et al., 2013).

Tentando contornar este problema, uma das alternativas testadas foi aplicação adicional de uma camada da solução de clorexidina, ou ácido hialuônico, ou de vitamina C de forma ativa. Estes são substâncias bioativas com potencial de manutenção da integridade do colágeno. O objetivo deste procedimento foi testar a possibilidade de melhora na

qualidade da camada híbrida, evitando a incompleta impregnação das fibras colágenas pelo sistema adesivo e conseqüente a degradação ao longo do tempo.

A clorexidina é um anti-séptico químico, que age matando as bactérias, com capacidade de eliminar tanto as gram-positivas quanto gram-negativas (Beraldo, Andrade, 2008). Também possui ação bacteriostática pois inibe a proliferação bacteriana. Foi sintetizada nos anos 40 e introduzida no mercado em 1954, como um anti-séptico para ferimentos na pele (Jones et al., 2000). Trata-se de um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos. Tem sido amplamente estudada na odontologia e atualmente em trabalhos que demonstram sua eficácia na manutenção ao longo do tempo da interface adesiva dentinária quando aplicada previamente ao sistema adesivo (Hebling et al., 2005, Carrilho et al., 2007b; Breschi et al., 2009; Scaffa et al., 2012). Segundo Gedron e colaboradores isso ocorre por que a clorexidina possuir a capacidade de inibição das MMPs (Gendron et al., 1999; Breschi et al., 2010) e conseqüentemente prevenção da degradação do colágeno (Osório et al., 2011).

Fraser et al. (1997) descreveram o Ácido hialurônico (AH) como um polissacarídeo encontrado em todos os tecidos e fluidos corporais dos vertebrados, bem como em algumas bactérias. É um polímero linear que pertence à classe dos glicosaminoglicanos que é sintetizado na membrana plasmática celular. As suas funções biológicas dependem do seu peso molecular e resultam da sua interação com determinadas proteínas de ligação (“hialaderinas”) e receptores de superfície, fato que confere ao AH excelentes características de sinalização celular. Por causa das propriedades físico-químicas do AH, várias funções fisiológicas foram atribuídas a ele, incluindo a lubrificação, homeostase da água, efeitos de filtragem e regulação do plasma das proteínas de distribuição. Na odontologia esta substância tem sido utilizada para estimular fibroblas-

tos e odontoblastos para auxiliar o processo de cicatrização. Na odontologia restauradora Bogovic et al. (2011), utilizaram o ácido hialurônico em capeamento pulpar e verificaram alta eficiência terapêutica desta substância, visto que proporciona uma proliferação dos odontoblastos e fibroblastos.

A vitamina C ou ácido ascórbico (AA) é classificada como vitamina hidrossolúvel e termolábil, destruído por temperatura por um período prolongado. Os seres humanos são incapazes de sintetizar o AA, devido à ausência da enzima gulonolactona oxidase capaz de realizar esta síntese a partir da glicose (Nelson D, Cox M 2000). Ácido ascórbico encontra-se predominantemente na sua forma ionizada, o ascorbato (C_6H_8O), (Gutteridge, Halliwell, 1992). Atua como um antioxidante usado para transformar os radicais livres oxigênio em formas inertes (Welch et al., 1995) e é essencial para a formação das fibras colágenas existentes em praticamente todos os tecidos do corpo humano incluindo a dentina.

O AA é co-fator para duas enzimas férricas essenciais na biossíntese do colágeno, a lisil e prolil hidroxilases (Pinnel et al., 1987). Atua na prevenção da oxidação do ferro desta enzima evitando sua auto-inativação. Estas enzimas catalisam a hidroxilação dos resíduos prolil e lisil nos polipeptídeos precursores do colágeno, e essas modificações pós-translacionais permitem a formação e estabilização do colágeno de tripla hélice, e sua subsequente secreção no espaço extracelular como procolágeno (Pinnel et al., 1987). O procolágeno é então transformado em tropocolágeno, (Chan et al., 1990). Dessa forma o AA promove a síntese de uma trama colágena madura e normal por meio da perfeita manutenção da atividade das enzimas lisil e prolil hidroxilases (Blanck, Peterkofsky, 1975; Geesin et al., 1988). Na odontologia restauradora é amplamente utilizado como agente antioxidante após o procedimento clareador e dentina tratada com hipoclorito, pois o ácido ascorbico agiria como agente antioxidante facilitando a polimerização dos adesivos resultando em melhora da resistência adesiva (Kimyai et al., 2010; Turkun et al.,

2009). O mecanismo de ação do ascorbato de sódio se dá por transferência de elétrons ou por adição de oxigênio (Buettner, 1993). Erhardt et al., em 2011, realizaram um estudo com o objetivo de determinar o papel de um agente antioxidante (ácido ascórbico-AA) quando adicionado a fórmula de dois sistemas adesivo na degradação da interface adesiva, os autores concluíram que a inclusão de AA na fórmula dos sistemas adesivos exerce um papel protetor na degradação da interface adesiva quando adicionado no sistema SB, segundo os autores isso pode ter ocorrido por dois mecanismos: (1) o ácido ascórbico promoveu a integridade do colágeno ou, (2) devido à ação inibitória das metaloproteinases que o ácido ascórbico possui.

As substâncias bioativas foram aplicadas previamente ao sistema adesivo de forma ativa. O tempo variou de acordo com achados na literatura (Ricci et al., 2010). Com relação à aplicação ativa, ela objetivou promover a movimentação da solução experimental na superfície da amostra, fazendo com que o maior número de moléculas entrasse em contato com o substrato (Pleffken et al., 2011). Desta forma, a taxa de reação não ficaria apenas na dependência da difusão das moléculas para o interior da amostra. O grau de difusão está diretamente relacionado a sua viscosidade e do seu conteúdo de água. Por este motivo todas as substâncias bioativas testadas apresentam em sua fórmula o mesmo veículo, o carbopol, o que lhes confere a forma de gel, facilitando a aplicação sobre as amostras.

O bom prognóstico de uma restauração se dá através de pesquisas que focam analisar seu comportamento físico-mecânico das interfaces adesivas, sendo um deles a técnica da nanoindentação. Para avaliação da resistência adesiva, este estudo utilizou teste de microtração, pois apesar dos testes mecânicos de macrotração, cisalhamento ou microtração apresentarem resultados semelhantes, o último permite avaliar as diferentes regiões de uma amostra e a incidência de fraturas adesivas (Phrukkanon et al., 1998). Segundo Pashley DH et al. (1995) este tipo de

fratura revele que o método foi efetivo para uma avaliação mais precisa da resistência de adesiva entre a tecidos dentários e o material restaurador. Por este motivo, nesta pesquisa consideramos para análise estatística somente as fraturas adesivas obtidas.

Nos últimos anos, as pesquisas realizadas na área de adesão têm demonstrado uma mudança de direcionamento, adicionando às análises de resistência adesiva imediata, as avaliações longitudinais da interface, já que a longevidade é a razão maior dos esforços dos profissionais (Sano et al., 1995; Sano et al., 1999; Van Meebeek et al., 2000; Torii et al., 2002; Breschi et al., 2008). Dessa forma, estudos de longevidade, que consiste em armazenar os espécimes após certo período de tempo, são métodos indicados para avaliar o prognóstico de uma restauração adesiva (Nikaido et al., 2002; Loguercio et al., 2005). Para tal, são utilizadas diversas soluções de armazenamento em estudos *in vitro*, sendo utilizado nesta pesquisa água destilada (Hashimoto et al., 2002; Sadek et al., 2003; Salz et al., 2005), por ser a mais comumente utilizada.

Baseado na literatura para avaliar a qualidade da camada híbrida obtida pela aplicação adicional de agentes bioativos utilizamos a técnica da nanoindentação que avaliou a sua influência no nível da dureza e módulo de elasticidade da camada híbrida, buscando elucidar os resultados obtidos de resistência adesiva conseguida pelo teste de microtração (Dos Santos, 2011). Esta técnica foi selecionada por possibilitar a realização de medidas de dureza superficial na escala de nanômetros com profundidade de penetração de alguns décimos de microns (Michler, Dommann, 2001), ou seja, permite medidas de nanodureza de determinada área sem influência de outras. Os ensaios produzidos por nanoindentação não são destrutivos, uma vez que a impressão residual, produzida nas superfícies indentadas, não pode ser vista sem a devida ampliação das indentações.

Empregamos para o teste de nanodureza, um número de amostras semelhante ao dos trabalhos consultados na literatura. Com

isso foram utilizados grupos compostos de cinco amostras, assim como outros autores (Oyen et al., 2006; Inoue et al., 2009; Aizawa et al., 2008; Pongprueksa et al., 2008; Higashi et al., 2009; Hosoya et al., 2010) e as análises foram feitas somente no grupo do armazenamento por seis meses, pois estudos de propriedades mecânicas são criteriosos o que o torna dispendioso em tempo de trabalho e custo, e também pelo motivo do foco deste estudo estar na observação da manutenção da camada híbrida ao longo do tempo pelas substâncias bioativas comparadas ao grupo controle.

6.2 Dos Resultados

Neste estudo foi utilizado um modelo *in vitro* com a intenção de simular as condições fisiológicas durante o processo adesivo (Bayne, 2012). Nosso objetivo foi avaliar resistência de união da interface adesiva formada por sistema adesivo convencional associado a diferentes substâncias bioativas (Cloroxidina, Ácido Hialurônico e Vitamina C) em diferentes períodos (24 h e 6 meses) e sua influencia nas propriedades mecânicas da camada híbrida.

Os espécimes foram seccionados de modo a se obter palitos com área adesiva entre 1 e 2 mm², pelo fato da resistência à tração ser inversamente proporcional à área adesiva (Sano et al., 1994; Phrukkanon et al., 1998). A obtenção de espécimes neste tamanho proporciona menor número de defeitos iniciais e a distribuição da força é mais homogênea, por isso a resistência de união é mais precisa.

O teste de microtração tem sido amplamente empregado para verificar o comportamento da interface adesiva após a realização do procedimento restaurador (Ermis et al., 2008). Porém mais atualmente as

pesquisas tem se voltado a avaliar a longevidade das restaurações através da técnica de armazenamento (Manuja et al., 2012).

De acordo com De Munck et al. (2005), a resistência adesiva imediata não pode ser relacionada com a durabilidade das restaurações, visto que a degradação da camada híbrida ocorre com o tempo, quando em contato com a água, e é favorecida pela dificuldade de infiltração dos monômeros resinosos, que resulta em colágeno exposto suscetível a ação dos fluídos orais e das MMPs, comprometendo a longevidade da restauração (Shirai et al., 2005; Hashimoto, 2010). A degradação das fibras colágenas leva à queda da resistência adesiva ao longo do tempo, tal fato foi observado na presente pesquisa (Figura 16) onde em todos os grupos apresentaram diminuição dos valores de resistência adesiva após 6 meses de armazenamento.

Outro objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades mecânicas (nanodureza e módulo de elasticidade), da camada híbrida obtida com a aplicação da substância bioativa, após armazenamento de 6 meses e comparar com o grupo controle.

É esperado nas restaurações adesivas um ótimo desempenho na adesão ao substrato que é obtido através da formação da camada híbrida sendo que a sua durabilidade esta diretamente relacionada com a estabilidade de seus componentes ao longo do tempo (Yasuda et al., 2008). Portanto o estudo das propriedades mecânicas desta camada nos diferentes grupos estudados, após o processo de armazenamento é de grande valia a fim de se obter informações sobre possíveis falhas ocorridas ao longo do tempo, com o objetivo de complementar os resultados obtidos no teste de microtração.

Para isso, foram realizadas 5 nanoindentações na camada híbrida em cada amostra. Sua dureza e o módulo de elasticidade podem ser influenciados por diversos fatores: Propriedades físicas da dentina (Hosoya et al., 2005), o sistema adesivo aplicado bem como a eficácia da hibridização (Hosoya, 2006; Hosoya, 2008).

Com intuito de controlar ou prevenir a hidrólise da fibra colágena pertencente da camada híbrida avaliamos a interferência da clorexidina, do ácido hialurônico e vitamina C na camada híbrida.

Tem-se observado recentemente o papel e a função das enzimas que degradam as fibras colágenas, as metaloproteinases de matriz (MMP) e catepsinas em dentina (Tjäderhane et al., 2013). A clorexidina tem sido comumente avaliada como possível agente bioativo capaz de aumentar a durabilidade das restaurações adesiva, por possuir a capacidade de inibir a MMP-2, -9 e -8 (Pashley DH et al., 2004; Gendron et al., 1999; Mazzoni et al., 2013), e das catepsinas (Scaffa et al., 2012). Tal fato ocorre, por esta substância agir como quelante, ou seja, seqüestradora de cálcio, competindo assim pelo sítio de cálcio com as MMPs que é dependente deste elemento para sua ativação (Gendron et al., 1999). Estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram resultados promissores na resistência adesiva com diminuição da atividade colagenolítica em amostras armazenadas (Hebling et al., 2005; Carrilho et al., 2007; Brackett et al., 2007), o que corrobora com nossos resultados onde após armazenamento por 6 meses obtivemos melhora na RA (Tabela 2) com o valor médio superior ($21,68 \pm 1,7$) ao do grupo controle ($17,79 \pm 1,1$). Após 6 meses de armazenamento o grupo controle teve redução da RA em 32,09% enquanto o grupo tratado com clorexidina reduziu a RA em 16,29% (Figura 17). Também foi observado que a aplicação da solução de clorexidina 2% não interferiu na resistência adesiva imediata onde não foram encontradas diferenças estatísticas entre este grupo experimental (G2) e o grupo controle (G1), tabela 4, resultado semelhante ao obtido em outros estudos (Bengtson et al., 2008; Chang, Shin, 2010). É importante salientar que alguns estudos afirmam que a efetividade da clorexidina ocorre na concentração de 2%, não sendo efetivo em concentrações baixas (Campos et al., 2009; Breshi et al., 2010; Zhou et al., 2011), o que justifica a escolha da concentração de nosso estudo em 2%. Com relação à nanodureza e módulo de elasticidade este tratamento dentinário não apresentou diferença estatística sig-

nificante com relação ao grupo controle (Tabela 8 e 9), o que nos revela que esta substância bioativa não apresenta efeito deletério à camada híbrida ao longo do tempo.

Outro fator que provoca a perda precoce de uma restauração adesiva é a presença do colágeno desprotegido na região inferior à camada híbrida, ou seja a discrepância entre a região desmineralizada e a penetração do sistema adesivo (Pashley DH et al., 2004).

É sabido que após o condicionamento ácido a manutenção da água nos espaços interfibrilares é de suma importância para a obtenção de uma infiltração adequada dos monômeros resinosos (Tay et al., 1996). A forma pela qual a água interage com as fibras colágenas mantendo os espaços pré-existent, ocorre através da teoria da solubilidade.

Hansen (1969) descreveu esta teoria para determinar e prever a miscibilidade de diferentes substâncias químicas. Para que uma substância líquida seja considerada com alto poder de solubilidade, suas moléculas devem ter a capacidade de vencer as forças de coesão, que unem as moléculas que constituem o soluto (forças de Van der Waals, que são forças de natureza eletromagnéticas).

Esta teoria foi adaptada por Miller et al. (1998) na odontologia onde se aplica na interação entre fibras colágenas e monômero resinoso. Extrapolando tais conceitos para o procedimento adesivo, a expansão ou o colapso das fibras colágenas ocorre pela presença ou não da água. Na ausência de água, ocorre à contração da trama colágena, e pelo contato ocorre a formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas, tornado-a rígida. Para a matriz colágena reexpandir e reocupar suas dimensões primárias ao nível do estado original hidratado, há necessidade de o solvente possuir alto poder de solubilidade, o suficiente para romper as pontes de hidrogênio formadas anteriormente. Muitos dos sistemas adesivos que se encontram no mercado não possuem alto poder de solubilidade quando comparado com a água, fazendo-se necessário manter a umidade da dentina (Tay, Gwinnett, 1996). Entretanto, a técnica da denti-

na úmida faz com que a aplicação do sistema adesivo seja sensível e bastante dependente do conhecimento do operador.

O ácido hialurônico é um polissacarídeo polianiónico e quando em ambiente úmido se liga a água por pontes de hidrogênio através de seus grupos carboxila e N-acetil, conferindo a esta substância capacidade de absorver água e dureza conformacional, que limita sua flexibilidade (Chong et al., 2005). A promoção de um ambiente úmido pela ação higroscópica do ácido hialurônico pode ter proporcionado a efetiva infiltração dos monômeros resinosos o que conseqüentemente pode ter exercido uma maior proteção ao colágeno previamente desmineralizado através da imobilização das MMPs (Osório et al., 2011). Tais fatos podem justificar os maiores valores médios obtidos na resistência adesiva após 6 meses de armazenamento (G3) com relação ao grupo controle (G1), tabela 5. Em estudos de capeamento pulpar direto Bogovic et al. (2011) relataram que o número e a qualidade dos fibroblastos e odontoblastos foi maior quando na presença de ácido hialurônico, em contraste com os grupos que utilizaram somente o sistema adesivo e o hidróxido de cálcio, concluindo que o ácido hialurônico é menos tóxico e mais biocompatível com a polpa.

Com relação à nanodureza, ao aplicar o teste Anova pode-se observar diferença estatística entre os grupos analisados neste estudo (Tabela 7). Para tanto, foi realizado na seqüência o teste de Tukey para comparar os grupos (Tabela 8), onde se observou maior valor da nanodureza para o grupo que recebeu como tratamento o ácido hialurônico ($42,1 \pm 2,3$).

A formação da camada híbrida consiste em um processo que implica na ocorrência de mecanismos químico-físicos. O primeiro deles é a desmineralização parcial ou total dos cristais minerais na dentina intertubular e peritubular hígidas. Esta desmineralização provoca o mecanismo subseqüente, que resulta no desnudamento das fibras colágenas da matriz dentinária, tornando-se susceptível ao terceiro mecanismo que

é a infiltração dos monômeros adesivos hidrofílicos para o interior da rede colágena, criando uma cadeia molecular composta por polímero biológico e artificial (Nakabayashi et al., 1992; Sano et al., 1994). Acredita-se que esta malha colágena presente no interior da camada híbrida aumenta sua rigidez e conseqüentemente seus valores de dureza (Van Meerbeek et al., 1993; Aizawa et al., 2008; Hosoya et al., 2009). Extrapolando tais informações para os resultados obtidos neste estudo, podemos supor que o ácido hialurônico pode ter contribuído para uma menor degradação das fibras colágenas durante o processo de armazenamento, quando comprado ao grupo controle, o que justifica também seu maior valor na RA. Tal fato pode ter ocorrido por esta substância bioativa assegurar uma maior penetração do adesivo, levando a uma maior concentração de monômeros no interior da camada híbrida protegendo-a contra a degradação. Outra hipótese é que este tratamento assegurou também maior grau conversão de monômeros para polímeros, segundo Dewald e Ferracane (1987) o grau de conversão de carbono de ligações duplas para carbonos de ligação única está diretamente relacionada com o seu valor de dureza. Após a polimerização formou-se uma camada mais resistente, que possui um maior valor de nanodureza (Katz et al., 2003; Higashi et al., 2009). Porém mais estudos devem ser realizados para verificar as interações desta substância com os constituintes da composição dos sistemas adesivos e componentes da dentina.

Com o intuito de melhorar a qualidade da camada híbrida, utilizamos a vitamina C como agente bioativo por ter ação antioxidante, sendo usado para transformar os radicais livres de oxigênio em formas inertes (Welch et al., 1995; Soeno et al., 2008). A presença de oxigênio influencia negativamente a polimerização do sistema adesivo, reduzindo a formação de cadeias poliméricas permitindo assim a presença de monômeros não polimerizados que atuam como falhas no interior da camada híbrida (Gauthier et al., 2005; Navarra et al., 2012).

Ehardt et al. em 2011 realizaram um estudo com o objetivo de determinar o papel da vitamina C, quando adicionada a fórmula de sistemas adesivos na degradação da interface adesiva. Concluíram que a inclusão da vitamina C na fórmula dos sistemas adesivos exerceu um papel protetor na degradação da interface adesiva, o que também pode ter influenciado nos nossos resultados, visto que a vitamina C apresentou 18,66% de redução na resistência adesiva após armazenamento de 6 meses, quando comparado ao grupo controle com 32,09% (Figura 16 e 17).

Entretanto este agente bioativo é um ácido orgânico com baixo pH, inferior ao crítico para o início da desmineralização do esmalte dental ($\text{pH}=5,5$), podendo causar erosão, com perda irreversível dos tecidos dentais duros. Tais fatos podem ter ocasionado o baixo valor na resistência adesiva deste grupo em todas as estratégias de armazenamento (Tabela 4 e 5), bem como a menor dureza da camada híbrida (Vitamina C = $25,4 \pm 2,8$ / Controle = $37,1 \pm 1,6$).

O módulo de Young ou módulo de elasticidade é um parâmetro mecânico que proporciona uma medida da rigidez de um material sólido, e depende principalmente da composição, estrutura e natureza das ligações químicas entre os elementos. Segundo alguns autores, o conhecimento do módulo de elasticidade da interface adesiva é necessário para avaliar a sua capacidade de amortecimento diante de forças oclusais e a tensão gerada pela contração de polimerização da resina composta durante a restauração (Van Meerbeek et al., 1993; Pongprueska et al., 2008). Observamos em nossos resultados que não houve diferença estatística dos grupos experimentais com relação ao grupo controle (Tabela 9), o que nos leva a concluir que os agentes bioativos analisados não causam efeito deletério à camada híbrida ao longo do tempo com relação a sua elasticidade.

É importante salientar que a comparação com a literatura em relação aos grupos experimentais ácido hialurônico e vitamina C fica

comprometida, pois não foram encontrados estudos semelhantes para serem confrontados com nossos resultados.

Embora os resultados obtidos por este estudo com a utilização de diferentes agentes bioativos (Clorexidina, ácido halurônico e vitamina C) não possam ser diretamente extrapolados para uma situação clínica, podemos sugerir-lo para o desenvolvimento de novas estratégias a fim de manter a resistência de união dentina-resina ao longo do tempo, aumentando assim a durabilidade das restaurações adesivas sendo um indicador para novas pesquisas sobre o assunto.

7 CONCLUSÃO

- Todas as substâncias bioativas empregadas reduziram os valores de RA após seis meses de armazenamento;
- O emprego unicamente do sistema adesivo (controle) apresentou os menores valores de RA após seis meses de armazenamento;
- O melhor comportamento ocorreu com a clorexidina e ácido hialurônico após seis meses;
- O ácido hialurônico apresentou maior valor de nano-dureza, confirmando uma malha colágena com maior rigidez;
- O módulo de elasticidade da camada híbrida foi semelhante em todos os grupos estudados o que revela que tais substâncias não provocaram efeito deletério e;
- Mais pesquisas se fazem necessárias para comprovar a eficiência das substâncias bioativas.

8 REFERÊNCIAS*

Aizawa K, Kameyama A, Kato J, Oda Y, Hirai Y. Nano-hardness of adhesive interface between Er:YAG laser-irradiated dentin and 4-META/MMA-TBB resin. *Photomed Laser Surg.* 2008 Apr;26(2):107-11.

Albaladejo A, Osorio R, Toledano M, Ferrari M. Hybrid layers of etch-and-rinse versus self-etching adhesive systems. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Jan 1;15(1):112-8.

Anido AA. Dentina humana e bovina, estudo comparativo da resistência adesiva em três diferentes profundidades: teste de cisalhamento [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2001.

Anido AA. Dentina humana e bovina - estudo da profundidade de desmineralização e da espessura da hibridização empregando-se um sistema adesivo convencional ou autocondicionante: análise em MEV [tese]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2005.

Arrais CA, Giannini M. Morphology and thickness of the diffusion of resin through demineralized or unconditioned dentinal matrix. *Pesqui Odontol Bras* 2002 Apr-Jun;16(2):115-20.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR NM ISO 6506-1: Materiais metálicos – Ensaio de dureza Brinell . Parte 1: Método de ensaio. São Paulo: ABNT; 2010.

Baba N, Taira Y, Matsumura H, Atsuta M. Effect of disinfectants containing glutaraldehyde on bonding of a tri-n-butylborane initiated resin to dentine. *J Oral Rehabil.* 2002 May;29(5):478-83.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barkmeier WW, Shaffer SE, Gwinnett AJ. Effects of 15 vs 60 second enamel acid conditioning on adhesion and morphology. *Oper Dent*. 1986 Summer;11(3):111-6.

Bayne SC. Correlation of clinical performance with 'in vitro tests' of restorative dental materials that use polymer-based matrices. *Mater Dent*. 2012 Jan;28(1):52-71.

Bengston CRG, Bengston AL, Bengston NG, Turbino ML. Effect of 2% chlorhexidine on the bond strength of two adhesive systems to human dentin. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa*. 2008 Jan/abr;8(1):51-6.

Beraldo CC, Andrade D. Oral hygiene with chlorhexidine in preventing pneumonia associated with mechanical ventilation. *J Bras Pneumol*. 2008;34(9):707-14.

Bertolotti RL. Posterior composite technique utilizing directed polymerization shrinkage and a novel matrix. *Periodontia Pract Dent qualidade estetica*. 1991 Jun-Jul;3(4):53-8.

Blanck TJ, Peterkofsky B. The stimulation of collagen secretion by ascorbate as a result of increased proline hydroxylation in chick embryo fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*. 1975 Nov;171(1):259-67.

Bogović A, Nižetić J, Galić N, Zelježić D, Micek V, Mladinić M. The effects of hyaluronic acid, calcium hydroxide, and dentina adhesive on rat odontoblasts and fibroblasts. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2011;62(2):155-1.

Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. *Exp Cell Res*. 2005;304(2):493-505.

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 Mar-Apr;32(2):107-11.

Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al., Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent*. 2009;11(3):191-8.

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

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

Brotzen FR. Mechanical testing of thin films. *Int Mater Rev.* 1994;39(1):24.

Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 1993 Feb 1;300(2):535-43.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res.* 1955 Dec;34(6):849-53.

Burrow MF, Satoh M, Tagami J. Dentin bond durability after three years using a dentin bonding agent with and without priming. *Dent Mater.* 1996 Sep;12(5):302-7.

Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al., Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005 Dec;113(6):525-30.

Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Ferlazzo AM, Calatroni A. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. *Chem Biol Interact.* 2004 Jul 20;148(3):125-38.

Campos EA, Correr GM, Leonarde DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpar pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent.* 2009;37:108-14.

Cardoso MV, de Almeida Neves A, A Mina, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J.* 2011 Jun; 56:31-44.

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

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

Carrilho MR, Reis A, Loguercio AD, Rodrigues Filho LE. Bond strength of four adhesive systems to dentin. *Pesqui Odontol Brás*. 2002 Jul-Sep;16(3):251-6.

Carvalho RM, Mendonça JS, Santiago SL, Silveira RR, Garcia FC, Tay FR, Pashley DH. Effects of HEMA/solvent combinations on bond strength to dentin. *J Dent Res*. 2003 Aug;82(8):597-601.

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 Mar;26(9):1035-42.

Cavalcanti AN, Santos-Daroz CB, Voltarelli FR, Lima AF, Peris AR, Marchi GM. Effect of the storage periods on the bond strength of a self-etch system to bovine dentin. *Rev Odontol UNESP*. 2009;38(4):222-7.

Celik C, Erkut S, Gulsahi K, Yamanel K, Kucukesmen C. Effect of sodium ascorbate on bond strength of different adhesive systems to NaOCl-treated dentin. *Aust Endod J*. 2010 Apr;36(1):12-8.

Chan D, Lamande SR, Cole WG, Bateman JF. Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation *in vitro*. *J Biol Chem*. 1990;269(1):175-81.

Chang YE, Shin DH. Effect of chlorhexidine application methods on microtensile bond strength to dentin in Class I cavities. *Oper-Dent*. 2010 Nov-Dec;35(6):618-23.

Cho BH, Dickens SH. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent Mater*. 2004 Feb;20(2):107-15.

Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 Jan;66(4):341-51.

Craig R, Peyton A. Elastic and mechanical properties of human dentin. *J Dent Res*. 1958;37(4):710-8.

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

DeWald JP, Ferracane JL. A comparison of four modes of evaluating depth of cure of light-activated composites. *J Dent Res*. 1987 Mar;66(3):727-30.

Dos Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin-resin interface components. *J Biomech*. 2011 Jun;44(9):1691-4.

Eick JD, Robinson SJ, Chappell RP, Cobb CM, Spencer P. The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. Part III. *Quintessence Int*. 1993 Aug;24(8):571-82.

Erhardt MC, Osorio R, Viseras C, Toledano M. Adjunctive use of an anti-Oxidant agent to improve resistance of hybrid layers to degradation. *J Dent*. 2011 Jan;39(1):80-7.

Ermis RB, De Munck J, Cardoso MV, Coutinho E, Van Landuyt KL, Poitevin A, et al. Bond strength of self-etch adhesives to dentin prepared with three different diamond burs. *Dent Mater*. 2008 Jul;24(7):978-85.

Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997 Jul;242(1):27-33.

Fusayama T. Total etch technique and cavity isolation. *J Esthet Dent*. 1992 Jul-Aug;4(4):105-9.

Garberoglio R, Brännstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976 Jun;21(6):355-62.

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

Gauthier M, Stangel I, Ellis T, Zhu X. Oxygen inhibition in dental resins. *J Dent Res*. 2005;84(8):725-9.

Geesin JC, Darr D, Kaufman R, S Murad, Pinnell SR. Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast. *J Invest Dermatol*. 1988 Apr;90(4):420-4.

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(3):437-9.

Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(2):103-14.

Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of anti-oxidant protection. *Chem Biol Interact.* 1994;91:133-40.

Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of free radicals in biology and medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med.* 1992;12(1):93-5.

Halicka HD, Mitlitski V, Heeter J, Balazs EA, Darzynkiewicz Z. Attenuation of the oxidative burst-induced DNA damage in human leukocytes by hyaluronan. *Int J Mol Med.* 2009 May;23(5):695-9.

Hansen CM. The universality of the solubility parameter. *Indust Eng Chem Prod Res Dev.* 1969;8:2-11.

Hashimoto M, Fujita S, Nagano F, Ohno H, Endo K. Ten-years degradation of resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci.* 2010 Aug;118(4):404-10.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al., Micro-morphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(3):306-11.

He LH, Fujisawa N, Swain MV. Elastic modulus and stress-strain response of human enamel by nano-indentation. *Biomaterials.* 2006 Aug;27(24):4388-98.

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

Hibino Y, Kuramochi K, Hoshino T, Moriyama A, Watanabe Y, Nakajima H. Relationship between the strength of glass ionomers and their adhesive strength to metals. *Dent Mater.* 2002 Nov;18(7):552-7.

Higashi C, Michel MD, Reis A, Loguercio AD, Gomes OM, Gomes JC. Impact of adhesive application and moisture on the mechanical properties of the adhesive interface determined by the nano-indentation technique. *Oper Dent.* 2009 Jan-Feb;34(1):51-7.

Hilton TJ, Schwartz RS. The effect of air thinning on dentin adhesive bond strength. *Oper Dent.* 1995 Jul-Aug;20(4):133-7.

Hodge HC. Hardness testes on teeth. *J Dent Res.* 1936;15:271-9.

Hosoya Y. Hardness and elasticity of bonded carious and sound primary tooth dentin. *J Dent.* 2006 Feb;34(2):164-71.

Hosoya Y, Marshall GW. The nano-hardness and elastic modulus of sound deciduous canine dentin and young premolar dentin-preliminary study. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 Jan;16(1):1-8.

Hosoya Y, Tay FR, Miyazaki M, Inoue T. Hardness and elasticity of sound and caries-affected primary dentin bonded with one-step self-etch adhesive. *Dent Mater J*. 2007 Jul;26(4):493-500.

Hosoya Y, Tay FR, Miyakoshi S, Pashley DH. Hardness and elasticity of caries-affected and sound primary tooth dentin bonded with 4-META one step self-etch adhesives. *Am J Dent*. 2008 Aug;21(4):223-8.

Hosoya Y, Tay FR, Ono T, Miyazaki M. Hardness, elasticity and ultrastructure of primary tooth dentin bonded with a self-reinforcing one-step self-etch adhesive. *J Dent*. 2010 Mar;38(3):214-21.

Huhtala MFRL. Avaliação laboratorial da resistência ao cisalhamento de discos de porcelana e de um polímero de vidro à dentina bovina com o emprego de cimentos adesivos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP- Univ Estadual Paulista; 1999.

Inoue T, Saito M, Yamamoto M, Debari K, Kou K, Nishimura F, et al., Comparison of nanohardness between coronal and radicular intertubular dentin. *Dent Mater J*. 2009 May;28(3):295-300.

Iwaku M, Nakamichi I, Nakamura K, Horie K, Suizu S, Fusayama T. Tags penetrating dentin of a new adhesive resin. *Bull Tokyo Med Dent Univ*. 1981 Jun;28(2):45-51.

Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control*. 2000 Apr;28(2):184-96.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, et al. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. *J Dent Res*. 2012 Dec;91(12):1119-23.

Kim DS, Kim J, Choi KK, Kim SY. The influence of chlorhexidine on the remineralization of demineralized dentine. *J Dent*. 2011 Dec;39(12):855-62.

Kimyai S, Oskoe SS, Rafighi A, Valizadeh H, Ajami AA, Helali ZN. Comparison of the effect of hydrogel and solution forms of sodium ascorbate on orthodontic bracket-enamel shear bond strength immediately after bleaching: an in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2010 Jan-Mar;21(1):54-8.

Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW Junior, Weihs TP. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Biol.* 1996 Jan;41(1):9-13.

Lafuente D. SEM Analysis of hybrid layer and bonding interface after chlorhexidine use. *Oper Den.* 2012;87(2):172-80.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Princípios de Bioquímica.* 4 .ed. São Paulo: Savier; 2006.

Li H, Chen C, Zhang S, Jiang J, Tao H, Xu J, et al. The use of layer by layer self-assembled coatings of hyaluronic acid and cationized gelatin to improve the biocompatibility of poly(ethylene terephthalate) artificial ligaments for reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Acta Biomater.* 2012 Nov;8(11):4007-19.

Liao YH, Jones SA, Forbes B, Martin GP, Brown MBHyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery. *Drug Deliv.* 2005 Nov-Dec;12(6):327-42.

Löe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res.* 1970;5(2):79-83.

Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci.* 2009 Oct;117(5):587-96.

Loguercio AD, Uceda-Gomez, Carrilho MRO, Reis A. Influence of specimen size and regional variation on long-term resin-dentin bond strength. *Dent Mater.* 2005;21(3):224-31.

Machado C, Lacefield W, Catledge A. Human enamel nanohardness, elastic modulus and surface integrity after beverage contact. *Braz Dent J.* 2008;19(1):68-72.

Mahoney E, Holt A, Swain M, Kilpatrick N. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: an ultra-micro-indentation study. *J Dent.* 2000 Nov;28(8):589-94.

Manuja N, Nagpal R, Pandit IK. Dental adhesion: mechanism, techniques and durability. *J Clin Pediatr Dent*. 2012 Spring;36(3):223-34.

Marshall GW, Habelitz S, Gallagher R, Balooch M, Balooch G, Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. *J Dent Res*. 2001 Aug;80(8):1768-71.

Marshall GW Junior. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence Int*. 1993 Sep;24(9):606-17.

Masouras K, Akhtar R, Watts DC, Silikas N. Effect of filler size and shape on local nanoindentation modulus of resin-composites. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Dec;19(12):3561-6.

Mazaheri H, Khoroushi M, Shafiei E, Ghorbanipour R, Majdzade F. Bond strength of composite-resin and resin-modified glass ionomer to bleached enamel: delay bonding versus an antioxidant agent. *Indian J Dent Res*. 2011 May-Jun;22(3):432-5.

Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res*. 2013 Jan;92(1):82-6.

Mendes RM, Silva GA, Caliar MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sci*. 2010 Aug;87(7-8):215-22.

Mendes RM, Silva GA, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB, et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol*. 2008 Dec;53(12):1155-62.

Michler M, Dommann A. Nanohardness measurements for industrial applications. *Zeitschrift für Metallkunde*. 2001;92(9):1035-39.

Miller RG, Bowles CQ, Chappelow CC, Eick JD. Application of solubility parameter theory to dentin-bonding system and adhesive strength correlations. *J Biomed Mater Res*. 1998 Aug;41(2):237-43.

Muraguchi K, Shigenobu S, Suzuki S, Tanaka T. Improvement of bonding to bleached bovine tooth surfaces by ascorbic acid treatment. *Dent Mater J*. 2007 Nov;26(6):875-81.

Nakabayashi N, Ashizawa M, Nakamura M. Identification of a resin-dentin hybrid layer in vital human dentin created in vivo: durable bonding to vital dentin. *Quintessence Int*. 1992 Feb;23(2):135-41.

Nakabayashi N, Takeyama M, Kojima K, Masuhara E. Studies on dental self-curing resins (20) - adhesion mechanism of 4-META/MMA-TBB resin to dentine. *Shika Rikogaku Zasshi*. 1982 Jan;23(61):34-9.

Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res*. 1983;62:1076-81.

Nelson D, Cox M. *Principles of Biochemistry Third Edition (em inglês)*. Nova Iorque: Worth Publishers; 2000.

Nikaido T, Kunzelmann KH, Chen H, Ogata M, Harada N, Yamaguchi S, et al., Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin. *Dent Mater*. 2002;18(3):269-75.

Nomoto S, Kameyama A, Nakazawa T, Yazaki K, Amagai T, Kawada E, et al. Influence of ascorbic acid on bonding of peroxide-affected dentin and 4-META/MMA-TBB resin. *Clin Oral Investig*. 2006 Dec;10(4):325-30.

Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res*. 1983 Jan;62(1):7-10.

Ohkubo N, Iwata S, Chikada K, Kuriyama S, Narita M, Ishikawa T, et al. A retention comparison of two sealants. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1982;23(4):201-19.

Oliver WC, Pharr GM. Improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res* 1992Jun;7(6):1564-83.

Osório R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F, Toledano M. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci*. 2011 Feb;119(1):79-85.

Oyen ML. Nanoindentation hardness of mineralized tissues. *J Biomech*. 2006;39(14):2699-702.

Pashley DH. Bond strength versus dentin structure: a modeling approach. *Arch Oral Biol*. 1995;40(12):1109-18.

Pashley DH, Agee KA, Nakajima M, Tay FR, Carvalho RM, Terada RS, et al. Solvent-induced dimensional changes in EDTA-demineralized dentin matrix. *J Biomed Res Mater*. 2001;56(2):273-81.

Pashley DH. Smear layer: overview of structure and function. Proc Finn Dent Soc. 1992;88 Suppl 1:215-24.

Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. Dent Mater. 2011a Jan;27(1):1-16.

Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. Am J Dent. 2007 Feb;20(1):7-20.

Pashley DH, Tay FR, Imazato S. How to increase the durability of resin-dentin bonds. Compend Contin Educ Dent. 2011b Sep;32(7):60-4.

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

Pashley EL, Tao L, Matthews WG, Pashley DH. Bond strength to superficial, intermediate and deep dentin *in vivo* with four dentin bonding systems. Dent Mater. 1993 Jan;9(1):19-22.

Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. J Dent. 1999 Mar;27(3):209-14.

Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. Am J Clin Nutr. 1991 Dec;54(6 Suppl):1135S-1140S.

Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. Effect of cross-sectional surface area on bond strengths between resin and dentin. Dent Mater. 1998 Mar;14(2):120-8.

Pinnel SR, Murad S, Darr D. Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. Arch Dermatol. 1987 Dec;123(12):1684-6.

Pleffken PR, de Almeida Lourenço AP, Torres CR, Bühler Borges A. Influence of application methods of self-etching adhesive systems on adhesive bond strength to dentin. J Adhes Dent. 2011 Dec;13(6):517-25.

Pongprueksa P, Kuphasuk W, Senawongse P. The elastic moduli across various types of resin/dentin interfaces. Dent Mater. 2008 Aug;24(8):1102-6.

Poolthong S, Mori T, Swain MV. Determination of elastic modulus of dentin by small spherical diamond indenters. *Dent Mater J*. 2001 Sep;20(3):227-36.

Rauscher FC. Avaliação in vitro da qualidade da interface de adesão formada entre um sistema adesivo convencional e um autocondicionante e a dentina bovina normal e hipermineralizada: estudo em MEV [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2003.

Ricci HA, Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Effect of chlorhexidine on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems to dentin of primary and permanent teeth. *Am J Dent*. 2010 Jun;23(3):128-32.

Sadek FT, Moura SK, Ballester RY, Muench A, Cardoso PE. The effect of long-term storage on the microleakage of composite resin restorations: quantitative evaluation. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(3):261-6.

Salz U, Zimmermann J, Zeuner F, Moszner N. Hydrolytic stability of self-etching adhesive systems. *J Adhes Dent*. 2005;1:107-16.

Sano H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res*. 1994 Jun;73(6):1205-11.

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 Jul-Aug;20(4):160-7.

Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, *in vivo*. *J Dent Res*. 1999 Apr;78(4):906-11.

Sarr M, Kane AW, Vreven J, Mine A, Van Landuyt KL, Peumans M, et al., Microtensile bond strength and interfacial characterization of 11 contemporary adhesives bonded to bur-cut dentin. *Oper Dent*. 2010 Jan-Feb;35(1):94-104.

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

Scheffel DL, Tenuta LM, Cury JA, Hebling J. Effect of acid etching time on demineralization of primary and permanent coronal dentin. *Am J Dent*. 2012 Aug;25(4):235-8.

Schulze KA, Oliveira SA, Wilson RS, Gansky SA, Marshall GW, Marshall SJ. Effect of hydration variability on hybrid layer properties of a self-etching versus an acid-etching system. *Biomaterials*. 2005 Mar;26(9):1011-8.

Sengün A, Unlü N, Ozer F, Oztürk B. Bond strength of five current adhesives to caries-affected dentin. *J Oral Rehabil*. 2002 Aug;29(8):777-81.

Shirai K, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Suzuki K, et al., Effect of cavity configuration and aging on bonding effectiveness of six adhesives to dentin. *Dent Mater*. 2005;21:110-24.

Soeno K, Taira Y, Jimbo R, Sawase T. Surface treatment with ascorbic acid and ferric chloride improves the micro-tensile bond strength of 4-META/MMA-TBB resin to dentin. *J Dent*. 2008 Nov;36(11):940-4.

Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int*. 1999 Jul;30(7):501-7.

Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent*. 2011 Jan;39(1):40-7.

Stern R. Hyaluronidases in cancer biology. *Semin Cancer Biol*. 2008 Aug;18(4):275-80.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2007 Feb;52(2):121-7.

Susin A, Oliveira O, Achutti M. Espessura de camada híbrida: influência de sistemas adesivos e condições do substrato dentinário. *J Bras Dent Estét*. 2003 Jul-Set;2(7):226-35.

Takemori T, Chigira H, Itoh K, Hisamitsu H, Wakumoto S. Factors affecting tensile bond strength of composite to dentin. *Dent Mater*. 1993 Mar;9(2):136-8.

Tay FR, Gwinnett JA, Wei SH. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free acetone-based, single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater*. 1996 Jul;12(4):236-44.

Tay FR, Kwong SM, Itthagarun A, King NM, Yip HK, Moulding KM, et al., Bonding of a self-etching primer to non-carious cervical sclerotic dentin:

interfacial ultrastructure and microtensile bond strength evaluation. *J Adhes Dent*. 2000 Spring;2(1):9-28.

Tay FR, Pashley DH. Water treeing--a potential mechanism for degradation of dentin adhesives. *Am J Dent*. 2003 Feb;16(1):6-12.

Tesch W, Eidelman N, Roschger P, Goldenberg F, Klaushofer K, Fratzl P. Graded microstructure and mechanical properties of human crown dentin. *Calcif Tissue Int*. 2001 Sep;69(3):147-57.

Tezel A, Fredrickson GH. The science of hyaluronic acid dermal fillers. *J Cosmet Laser Ther*. 2008 Mar;10(1):35-42.

Titley KC, Chernecky R, Rossouw PE, Kulkarni, GV. The effect of various storage methods and media on shear-bond strengths of dental composite resin to bovine dentine. *Arch Oral Biol*. 1998 Apr 43(4):305-11.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater*. 2013 Oct;29(10):999-1011.

Toledano M, Osorio R, Perdigao J, Rosales JI, Thompson JY, Cabrerizo-Vilchez MA. Effect of acid etching and collagen removal on dentin wettability and roughness. *J Biomed Mater Res*. 1999 Nov;47(2):198-203.

Torii Y, Itou K, Nishitani Y, Ishikawa K, Suzuki K. Effect of phosphoric acid etching prior to self-etching primer application on adhesion of resin composite to enamel and dentin. *Am J Dent*. 2002 Oct;15(5):305-8.

Türkün M, Celik U, Kaya D, Arici M. Can the hydrogel form of sodium ascorbate be used to reverse compromised bond strength after bleaching? *J Adhes Dent*. 2009 Feb;11(1):35-40.

Uno S, Finger WJ. Effects of acidic conditioners on dentine demineralization and dimension of hybrid layers. *J Dent*. 1996 May;24(3):211-6.

Urabe I, Nakajima S, Sano H, Tagami J. Physical properties of the dentin-enamel junction region. *Am J Dent*. 2000 Jun;13(3):129-35.

Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mina A, Van Ende A, Neves A, et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater*. 2010 Feb;26(2):e100-21.

Van Meerbeek B, Peumans M, Verschueren M, Gladys S, Braem M, Lambrechts P, et al. Clinical status of ten dentin adhesive systems. *J Dent Res*. 1994 Nov;73(11):1690-702.

Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Perdigao J, Lambrechts P, et al., Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am J Dent.* 2000 Nov;13(Spec No):3-18.

Van Meerbeek B, Willems G, Celis JP, Roos JR, Braem M, Lambrechts P, et al., Assessment by nano-indentation of the hardness and elasticity of the resin-dentin bonding area. *J Dent Res.* 1993 Oct;72(10):1434-42.

Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci.* 2011 Sep;53(3):273-82.

Yasuda G, Inage H, Kawamoto R, Shimamura Y, Takubo C, Tamura Y, et al. Changes in elastic modulus of adhesive and adhesive-infiltrated dentin during storage in water. *J Oral Sci.* 2008 Dec; 50(4):481-6.

Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by a phenyl-P self-etching primer. *J Dent Res.* 1994 Jun;73(6):1212-20.

Weindl G, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacol Physiol.* 2004 Sep-Oct; 17(5):207-13.

Welch RW, Wang Y, Crossman A Jr, Park JB, Kirk KL, Levine M. J Biol Chem. Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *J Biol Chem.* 1995 May 26;270(21):12584-92.

Zhou J , Tan J. , Yang X , Xu X , Li D , Chen L . MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. *J Adhes Dent.* 2011 Apr;13(2):111-5.