



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DO PROTOCOLO DE UM SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL- EFEITO DA CLORHEXIDINA

Trabalho submetido por
Ricardo Jorge Lopes Gois
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DO PROTOCOLO DE UM SISTEMA ADESIVO UNIVERSAL- EFEITO DA CLORHEXIDINA

Trabalho submetido por
Ricardo Jorge Lopes Gois
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Pedro Melo Moura

outubro de 2015

AGRADECIMENTOS

Este trabalho de investigação é o culminar de mais uma etapa na minha vida académica, porventura a de maior significado. Considero-me privilegiado por concluir esta precisa etapa nesta instituição, onde sei que cresci e aprendi com os melhores profissionais de ensino e clínicos da área.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, o Prof. Doutor Pedro Melo Moura por quem tenho muita admiração e estima, pela partilha dos seus conhecimentos, experiência, disponibilidade, orientações, simpatia e confiança em mim depositada.

Quero também agradecer ao Prof. Doutor Mário Polido pela sua disponibilidade, pelos conhecimentos que me transmitiu e pela simpatia com que me recebeu.

Ao Prof. Doutor Nuno Silva por quem tenho grande admiração, o meu sincero agradecimento. Foi essencial o seu contributo.

Ao Prof. Doutor Luís Proença pela sua disponibilidade e conhecimentos, que permitiram a elaboração da análise estatística.

Ao Prof. Doutor José João Mendes e restante corpo da direção clínica, pela importância que têm no funcionamento da CDUEM e para todos os alunos do instituto.

A todos os restantes docentes do instituto sem exceção que participaram no meu percurso, quero igualmente fazer referência pelas suas distintas competências profissionais e humanas.

Aos meus pais e irmão o meu agradecimento pela sua dedicação, confiança, apoio e amizade incondicionais. Sem eles nada do meu trajeto profissional e pessoal faria sentido e graças a eles se tornou possível.

Ao meu tio, que por partilharmos o mesmo rumo profissional, foi uma constante fonte de apoio e motivação.

À Bárbara Lafaia de Castro, minha parceira desde o primeiro dia, pela sua amizade, cumplicidade e paciência nos bons e maus momentos. Crescemos, partilhámos e evoluímos juntos nestes cinco anos, o meu obrigado.

À Dentina e FGM pelo seu patrocínio no fornecimento do material, pela confiança, disponibilidade e simpatia deixo igualmente o meu obrigado.

Uma palavra final de agradecimento ao João Botelho pela revisão do estudo, aos meus avós e a todos os meus restantes familiares e amigos que foram imprescindíveis neste percurso. É um privilégio para mim estarem presentes na minha vida.

A todos vocês, um sincero obrigado.

RESUMO

Objetivo: Avaliar *in vitro* a resistência adesiva à microtração (μ TBS) de um novo sistema adesivo universal à dentina, e influência da aplicação de clorhexidina (CHX), como complemento do protocolo adesivo nas vertentes *etch-and-rinse* e *self-etch*, e na resistência adesiva imediata e após termociclagem.

Materiais e Métodos: Trinta e dois molares humanos hígidos foram aleatoriamente distribuídos por 8 grupos experimentais ($n=4$), de acordo com o protocolo adesivo utilizado, a aplicação de CHX 2% e o tempo de envelhecimento, imediato a 24h ou após termociclagem. Após restauração com Filtek Z250, as amostras foram sujeitas a 10.000 ciclos de termociclagem e/ou armazenadas em saliva artificial por 24h a 37°C mediante o grupo testado e posteriormente seccionadas em palitos com secção transversal de $1 \pm 0,3\text{mm}^2$. Os palitos obtidos foram colados individualmente a um *jig* de Geraldeli de modo a testar a resistência adesiva de cada grupo experimental até ocorrer fratura a uma velocidade de 0,5mm/min. Efetuou-se análise estatística inferencial dos resultados mediante teste ANOVA One-Way com correção de Brown-Forsythe e teste de comparação múltipla Post-Hoc de Tamhane ($p<0,05$).

Resultados: A técnica *etch-and-rinse* apresentou uma média μ TBS mais alta, mas verificou-se maior estabilidade após envelhecimento na vertente *self-etch*. O Grupo ABU-ER4 (27,95 Mpa), apresentou significativamente uma maior estabilidade da média μ TBS quando comparado com o grupo controlo ABU-ER2 (19,01 Mpa). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos *self-etch*.

Conclusão: A aplicação de CHX 2% na dentina não influencia negativamente os valores adesivos no imediato e contribui significativamente para a preservação da integridade da camada híbrida na estratégia *etch-and-rinse*.

Relevância clínica: A introdução de CHX 2% no protocolo adesivo à dentina poderá ser um excelente método de aumento da estabilidade a longo termo da camada híbrida face ao potencial de degradação da interface adesiva por metaloproteínases endógenas.

Palavras Chave: Adesão, Clorhexidina, Dentina, Adesivo Universal

ABSTRACT

Purpose: To evaluate in vitro the dentine microtensile bond strength (μ TBS), of a new universal adhesive system, and influence of chlorhexidine (CHX), application as adhesive protocol complement in etch-and-rinse and self-etch modes in the immediate bond strength and after thermocycling.

Methods: Thirty-two healthy human molars were randomly assigned to eight experimental groups ($n = 4$), according to the adhesive protocol used (etch-and-rinse or self-etch), the CHX 2% application and the aging time (24 hours or immediately after thermocycling). After samples restoration with Filtek Z250, these were subjected to 10,000 cycles of thermocycling and/or stored in artificial saliva for 24 hours at 37°C according to the tested group and subsequently sectioned into resin-dentin sticks with $1 \pm 0,3\text{mm}^2$ cross sections. The obtained sticks were bonded individually to a Geraldini jig in order to test the adhesive strength of each experimental group until fracture occurs at a 0.5 mm/min cross head speed. An inferential statistical analysis by ANOVA One-Way with Brown-Forsythe correction and multiple comparison test Post-Hoc Tamhane ($p < 0.05$) was performed.

Results: The etch-and-rinse technique showed a higher μ TBS average, but there was greater stability after aging in self-etch protocol. The ABU-ER4 group (27,95 Mpa), showed significantly greater stability of μ TBS average when compared with the control group ABU-ER2 (19,01 Mpa). There were no significant differences between the self-etch groups.

Conclusion: The application of CHX 2% in dentin does not negatively influence the bond strength values immediately and significantly contributes to the preservation of the integrity of the hybrid layer in etch-and-rinse strategy.

Significance: The introduction of chlorhexidine digluconate 2% in dentin adhesive protocol can be an excellent method of increasing long-term stability of the hybrid layer over the potential degradation of the adhesive interface by endogenous metalloproteinases.

Key Words: Adhesion, Chlorhexidine, Dentin, Universal Adhesive

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	19
1. Adesão	19
2. Esmalte	20
3. Dentina.....	20
4. Adesão À Dentina.....	21
5. Classificação Dos Sistemas Adesivos	22
6. Sistemas Adesivos <i>Etch-And-Rinse</i>	23
7. Sistemas Adesivos <i>Self-Etch</i>	26
8. Sistemas Adesivos Universais Ou Multi-Modo	28
9. Fatores Que Comprometem A Estabilidade Da Interface Adesiva Na Dentina.....	30
10. Degradação Hidrolítica Da Camada Híbrida.....	31
10.1. Degradação Hidrolítica Por Sorção De Água.....	31
10.2. Degradação Hidrolítica Por Proteases Endógenas.....	32
11. Clorhexidina	35
12. Testes De Resistência Adesiva	38
12.1. Norma Iso/Ts 11405	38
12.2. Testes De Microtração.....	38
13. Envelhecimento De Amostras	40
13.1. Envelhecimento Por Termociclagem.....	40
II. OBJETIVOS E HIPÓTESES DE ESTUDO.....	41
Objetivos.....	41
Hipóteses De Estudo.....	41
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
Análise Estatística.....	53
IV. RESULTADOS	55
V. DISCUSSÃO	61
Perspetivas Futuras	71
VI. CONCLUSÃO.....	73
Relevância Clínica.....	75
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
VIII. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - A adesão à dentina é mais suscetível a nanoinfiltração. Imagens por TEM da interface demonstram este fenómeno pela presença de nitrato de prata (setas) dentro da camada híbrida, não acontecendo o mesmo na imagem correspondente ao esmalte (Yoshihara <i>et al.</i> , 2010).	22
Figura 2 - Esquema representativo das estratégias adesivas contemporâneas (Sezinando, 2014).	23
Figura 3 - Imagem por FESEM de dentina condicionada com ácido fosfórico a 32% durante 15 segundos (Sezinando, 2014).	24
Figura 4 - Imagem por FESEM de dentina condicionada com ácido fosfórico a 35% durante 15 segundos. De notar a desmineralização de 4-5µm, praticamente sem vestígios de hidroxiapatite em redor das fibras de colagénio expostas (Van Meerbeek <i>et al.</i> , 2003).	24
Figura 5 – Protocolo e interação com a dentina de um sistema adesivo <i>etch-and-rinse</i> de dois passos (Perdigão, 2007).	25
Figura 6 - Imagem por SEM de dentina condicionada com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos. A <i>smear layer</i> foi removida, criando uma fina zona desmineralizada com a rede de fibras de colagénio agora expostas (Alex, 2015).	25
Figura 7 - Protocolo e interação com a dentina de sistemas adesivos <i>self-etch</i> de dois passos e <i>all-in-one</i> (Perdigão, 2007).	27
Figura 8 – Imagem por TEM da interface dentina-adesivo de um sistema <i>self-etch</i> . A estrutura da interface depende da interação dos monómeros funcionais com o substrato e da acidez do adesivo (Van Meerbeek <i>et al.</i> , 2011).	27
Figura 9 - Imagem por FESEM de <i>smear layer</i> e <i>smear plug</i> na dentina (Perdigão, 2007).	28
Figura 10 - Imagens por CLSM do adesivo universal All-bond Universal (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) nas estratégias <i>etch-and-rinse</i> (A) e <i>self-etch</i> (B) (Wagner, Wendler, Petschelt, Belli & Lohbauer, 2014).	29
Figura 11 - Esquema representativo da degradação da interface adesiva ao longo do tempo mediante a presença de depósitos de nitrato de prata indicando a presença de água e/ou solvente retidos bem como áreas inadequadamente polimerizadas (Perdigão <i>et al.</i> , 2013).	31

Figura 12 - A. Imagem por SEM da rede de fibras de colagénio após condicionamento ácido e lavagem, os espaços entre as fibras estão agora preenchidos por água. B. Imagem por FESEM da morfologia de uma fibra de colagénio tipo I na dentina (Breschi <i>et al.</i> , 2008; Perdigão <i>et al.</i> , 2013).	34
Figura 13 - Representação esquemática da degradação da matriz de colagénio mediante a clivagem peptídica por MMPs (Strobel & Hellwig, 2014).	34
Figura 14 - Fórmula estrutural da molécula de clorhexidina (Strobel & Hellwig, 2014).	36
Figura 15 - Representação esquemática da ação da clorhexidina sobre as MMPs (Strobel & Hellwig, 2014).	37
Figura 16 - A. Superfície em dentina após instrumentação; B. Superfície após condicionamento com ácido fosfórico a 37% durante 15 segundos; C. Superfície após aplicação de digluconato de clorhexidina a 2% (Bengtson, Bengtson, Bengtson & Turbino, 2008).	37
Figura 17 - Esquema representativo do teste de microtração. (Adaptado de: Castro, Andrade, Duarte Júnior, Vaz & Ahid, 2003; De Munck <i>et al.</i> , 2005).	39
Figura 18 – Exemplo de dentes selecionados para o teste	43
Figura 19 – A. Dente pronto para corte; B. Dente após os cortes	45
Figura 20 – Polimento sob água corrente com lixa SiC	45
Figura 21 – A. Exemplo de amostra pronta para o teste; B. Grupo de amostras ABU-ER1	49
Figura 22 – A. Termociclador (Refri 200 E, ARALAB, Parede, Portugal); B. Estufa de incubação (Mettmert INE 400, Mettmert, Germany)	49
Figura 23 – A. Micrótopo de tecidos duros (Accuton 50, Struers A/S, Ballerup, Denmark); B. Exemplo de palitos após corte em micrótopo	50
Figura 24 – A. Máquina de Testes Universal (Shimadzu AG-50kNI SD MS, Shimadzu Corporation, Kyoto; Japan); B. <i>Jig</i> com palito antes de ser testado; C. Palito após fratura	50
Figura 25 - Craveira digital (Storm Digital Caliper, Pontoglio; Brescia, Itália)	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Material utilizado	44
Tabela 2 - Grupos Experimentais	47
Tabela 3 - Instruções do Fabricante All-Bond Universal® (Bisco Inc. Schaumburg, IL, USA).....	48
Tabela 4 - Instruções do Fabricante para Selective HV Etch	48
Tabela 5- Instruções do Fabricante para Clorhexidina S.....	48
Tabela 6 - Instruções do Fabricante Filtek™ Z250 (3M ESPE, St Paul, MN, USA)	48
Tabela 7 - Teste ANOVA One-Way: Média em MPa e Desvio Padrão das forças adesivas registadas nos grupos controlo <i>Etch-and-Rinse</i>	55
Tabela 8 - Teste ANOVA One-Way: Média em MPa e Desvio Padrão das forças adesivas registadas nos grupos controlo <i>Self-Etch</i>	56
Tabela 9 - Teste ANOVA One-Way: Média em MPa e Desvio Padrão das forças adesivas registadas nos grupos <i>Etch-and-Rinse</i>	57
Tabela 10 - Teste ANOVA One-Way: Média em MPa e Desvio Padrão das forças adesivas registadas nos grupos <i>Self-Etch</i>	58
Tabela 11 –Valores de força adesiva à microtração (MPa) registados e número de amostras nos grupos experimentais	59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos controlo <i>Etch-and-Rinse</i>	55
Gráfico 2 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos controlo <i>Self-etch</i>	56
Gráfico 3 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos <i>Etch-and-Rinse</i>	57
Gráfico 4 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos <i>Self-Etch</i>	58
Gráfico 5 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos testados. Médias com a mesma sigla indicam não haver diferenças significativas entre grupos ($p > 0,05$).	59
Gráfico 6 - Variância de distribuição dos valores de força adesiva (MPa) nos grupos testados	60
Gráfico 7 - Representação gráfica da distribuição de fraturas verificadas nos grupos testados	60

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

μTBS – Módulo de valor de microtração;

CHX – Clorhexidina;

TEM – Microscópio eletrônico de transmissão;

FESEM – Microscópio eletrônico de varrimento por emissão de campo;

SEM – Microscópio eletrônico de varrimento;

HEMA – 2-hidroxietil metacrilato;

10-MDP – 10-metacrilóiloxidecil dihidrogénio fosfato;

nm – Nanómetro;

μm – Micrómetro;

CLSM – Microscópio confocal a laser;

Bis-GMA – Bisfenol-A-glicidilmetacrilato;

TEDGMA – Trietilenoglicol dimetacrilato;

MMPs – Metaloproteinases;

mm² – Milímetro quadrado;

SA – Sistema adesivo

mW/cm² – Mili Watts por centímetro quadrado;

kN – Kilo Newton;

N – Newton;

MPa – Megapascal;

TC – Termociclagem.

I. INTRODUÇÃO

Os avanços dos adesivos dentários têm influenciado extensivamente a dentisteria restauradora moderna, desde a introdução dos conceitos técnicos de adesão de Buonocore em 1955 que foram a gênese da adesão dentária.

A adesão ao esmalte tem permanecido consistente desde então. Pelo contrário, a adesão à dentina tem-se verificado imprevisível, levando à sucessiva modificação dos sistemas adesivos (Coelho, Canta, Martins, Oliveira, & Marques, 2012).

As características hidrofílicas e acídicas dos atuais adesivos dentários, tornaram as camadas híbridas altamente suscetíveis à absorção de água e atividade proteolítica, causando a sua degradação e menor resistência adesiva ao longo do tempo (Perdigão, Reis, & Loguercio, 2013).

Nos últimos anos, a compreensão dos mecanismos envolvidos na degradação proteolítica da interface dentina-adesivo tem evoluído, sendo uma área de investigação atual, cujo objetivo passa pela descoberta de mecanismos de prevenção da atividade enzimática e pela simplificação da técnica adesiva.

1. ADESÃO

Segundo a norma ISO/TS 11405:2015, o conceito de adesão é definido como o “estado em que duas superfícies são mantidas unidas por forças químicas, mecânicas ou ambas com o auxílio de um adesivo”, a qual depende de uma forte interação molecular entre duas superfícies em íntimo contato (Breschi, Ferracane, Cadenaro, Mazzoni & Hilton, 2013).

Qualquer evento descrito como adesão requer um aderente ou substrato, usualmente esmalte ou dentina, e a aplicação de um adesivo que irá criar uma interface adesiva.

O princípio fundamental de adesão ao substrato dentário envolve um processo de troca, em que a matéria inorgânica removida dos tecidos dentários é substituída pela infiltração de monómeros nas microporosidades e subsequente polimerização da resina adesiva, num processo denominado de hibridização ou por conceito de adesão-descalcificação. A heterogeneidade da microestrutura do substrato contribui para uma variedade de opções de adesão, sendo por isso necessário o conhecimento das

características da superfície adesiva e aderente, para deste modo promover uma adesão eficiente (S. J. Marshall, Bayne, Baier, Tomsia & Marshall, 2010; Muñoz *et al.*, 2013; Van Meerbeek *et al.*, 2003).

2. ESMALTE

O esmalte é a matriz calcificada mais dura do corpo, sendo as suas células precursoras denominadas de ameloblastos. Apresenta uma complexa organização estrutural e um elevado nível de mineralização, denotando uma quase total ausência de matriz orgânica. A matriz de esmalte varia na sua espessura, apresentando na superfície oclusal um máximo de 2.5mm. Quanto à sua composição por volume, a matriz de esmalte completamente maturada consiste em aproximadamente 90-92% de matéria inorgânica, 1-2% de proteínas da matriz orgânica e 4-12% em água. A componente inorgânica do esmalte é formada por prismas de cristais de hidroxiapatite compostos por cálcio, fosfato e iões de carbono. Este elevado conteúdo mineral é responsável pela sua elevada dureza, o que permite que associado à sua organização estrutural, absorva as forças mecânicas geradas durante a função mastigatória (Boushell & Sturdevant, 2013; Nanci, 2013).

3. DENTINA

O conhecimento das propriedades e microestrutura da dentina são aspetos fundamentais na área da dentisteria restauradora. Ao contrário do esmalte, que é acelular e predominantemente mineralizado, a dentina é um tecido vivo e dinâmico (Breschi *et al.*, 2013; G. W. Marshall, Marshall, Kinney & Balooch, 1997).

Ao nível histológico do seu desenvolvimento, a dentina é primeiro depositada como uma camada de matriz desmineralizada, denominada de pré-dentina, que se situa na sua porção pulpar. Esta camada é gradualmente mineralizada em dentina por ação de proteínas não colagénicas que são incorporadas na frente de mineralização. A composição da dentina crê-se ser composta em volume, por 50% de material inorgânico, 25% de material orgânico e 25% de água (Perdigão, Swift & Walter, 2013).

A matriz orgânica é formada em 90% por colagénio, principalmente do tipo I, com pequenas quantidades do tipo III e V, e a restante percentagem composta por proteínas e lípidos. A matriz de colagénio do tipo I atua como uma estrutura que acomoda uma larga proporção (cerca de 56%) da matéria inorgânica (Nanci, 2013).

A dentina é caracterizada pela multiplicidade de túbulos dentinários que atravessam a sua inteira espessura, tornando-a permeável. Podem identificar-se dois tipos principais de dentina primária: a dentina intertubular, componente estrutural da matriz de colagénio e hidroxiapatite, e a dentina peritubular, limitada na proximidade dos túbulos dentinários. A dentina peritubular é densamente mineralizada e contém pouca matriz orgânica na sua composição. Fisicamente, a dentina tem propriedades elásticas fundamentais para a sua função, promovendo flexibilidade e prevenindo fraturas do esmalte que a recobre na sua porção coronal (Boushell & Sturdevant, 2013; Breschi et al., 2013; Nanci, 2013).

4. ADESÃO À DENTINA

Enquanto o esmalte é composto em 96% de cristais de hidroxiapatite, a dentina possui uma substancial componente de matéria orgânica e água na sua composição, que se traduz na inexistência de uma microestrutura padronizada, explicando em parte a maior dificuldade e imprevisibilidade na adesão (Figura 1) (Miyazaki *et al.*, 2014).

A dentina é um substrato dinâmico, vital e altamente variável mediante a sua profundidade, na sua estrutura e composição física e química (Alex, 2015; Boushell & Sturdevant, 2013).

O complexo dentina-polpa está intimamente interligado através de túbulos preenchidos por fluídos, que atravessam a dentina no seu todo até à junção amelo-dentinária. Uma vez sobre pressão, estes fluídos chegam à superfície da dentina exposta, tornando-a hidrofílica, sendo este acontecimento um dos grandes desafios dos sistemas adesivos (Miyazaki *et al.*, 2014).

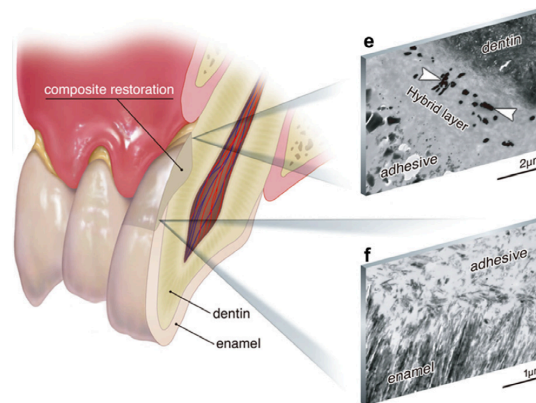


Figura 1 - A adesão à dentina é mais suscetível a nanoinfiltração. Imagens por TEM da interface demonstram este fenómeno pela presença de nitrato de prata (setas) dentro da camada híbrida, não acontecendo o mesmo na imagem correspondente ao esmalte (Yoshihara *et al.*, 2010).

Outro desafio colocado aos sistemas adesivos advém da preparação da cavidade dentária instrumentada, na qual ocorre a formação de uma camada de detritos à sua superfície, a *smear layer*, que ao obturar a entrada dos túbulos dentinários diminui a sua permeabilidade. Todavia, a *smear layer* é porosa e permeável, tendo na sua composição básica, hidroxiapatite e colagénio alterado. Pelo facto de a *smear layer* constituir uma barreira aos processos de adesão, esta deve ser removida ou permeabilizada consoante a estratégia adesiva aplicada, de modo a que os monómeros adesivos possam contactar a superfície da dentina diretamente (Perdigão, 2007).

5. CLASSIFICAÇÃO DOS SISTEMAS ADESIVOS

O conceito de adesão ao esmalte permaneceu consistente até aos dias contemporâneos, sendo considerado como o ‘*gold-standard*’ da adesão dentária (Sezinando, 2014).

Esta previsibilidade deve-se à sua estrutura homogênea, composta essencialmente por cristais de hidroxiapatite, organizados em prismas. No sentido inverso, a dentina como substrato foi sempre imprevisível, devido ao seu conteúdo em água e natureza orgânica (Coelho *et al.*, 2012; Perdigão *et al.*, 2013).

O grande objetivo das restaurações adesivas passa por conseguir um contacto íntimo entre os materiais restauradores e os tecidos dentários. O líquido adesivo deve molhar o aderente de modo a permitir uma interação estrutural entre ambos e a interface deverá estar protegida da degradação proteolítica gerada no meio intraoral (Sezinando, 2014).

Desse modo, à contínua evolução dos sistemas adesivos surgiu a necessidade de os classificar (Figura 2):

1. Segundo a forma de tratamento da *smear layer*, removendo-a no seu todo mediante condicionamento ácido (denominados sistemas adesivos de condicionamento total ou sistemas *etch-and-rinse*) ou incorporando-a (adesivos autocondicionantes ou *self-etch*) (Breschi *et al.*, 2013).
2. O número de passos clínicos associados à técnica adesiva- sistemas *etch-and-rinse* de 2 e 3 passos ou sistemas *self-etch* de 1 e 2 passos (Breschi *et al.*, 2013).
3. A geração adesiva a que pertencem (1ª a 7ª geração), cuja classificação necessita de contínuas atualizações pela introdução de novos adesivos no mercado (Coelho *et al.*, 2012).

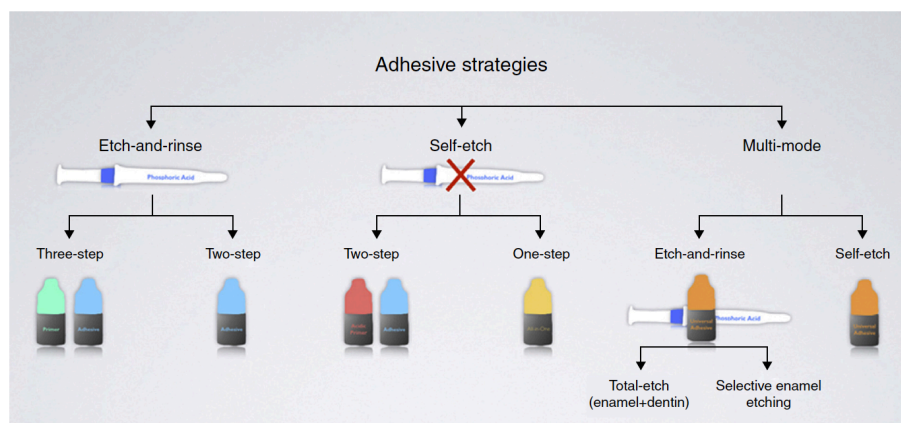


Figura 2 - Esquema representativo das estratégias adesivas contemporâneas (Sezinando, 2014).

6. SISTEMAS ADESIVOS *ETCH-AND-RINSE*

Em 1955, Buonocore foi o primeiro a demonstrar que o condicionamento ácido do esmalte com ácido fosfórico aumentava a resistência adesiva da interface resina-esmalte (Figura 3 e 4) (Breschi *et al.*, 2013; Pashley *et al.*, 2011).

Nakabayashi, Kojima e Masuhara (1982) foram os primeiros a demonstrar que resinas poderiam infiltrar o substrato dentinário condicionado, formando uma nova estrutura composta por uma matriz de resina reforçada por fibras de colagénio, à qual chamou de camada híbrida.

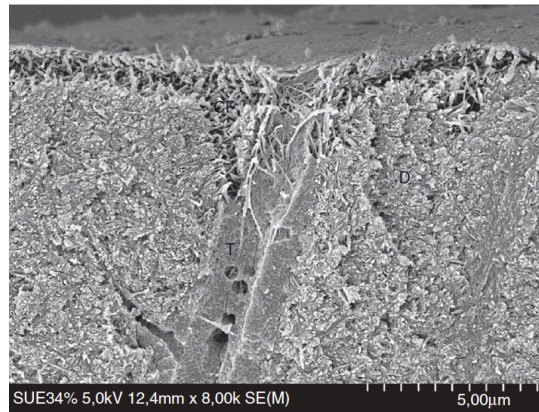


Figura 3 - Imagem por FESEM de dentina condicionada com ácido fosfórico a 32% durante 15 segundos (Sezinando, 2014).

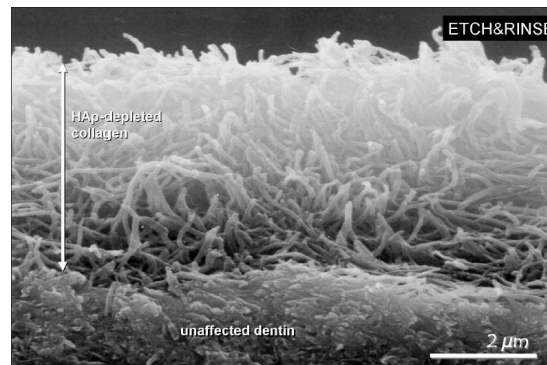


Figura 4 - Imagem por FESEM de dentina condicionada com ácido fosfórico a 35% durante 15 segundos. De notar a desmineralização de 4-5µm, praticamente sem vestígios de hidroxiapatite em redor das fibras de colagénio expostas (Van Meerbeek *et al.*, 2003).

A extensão pela qual uma superfície ou material interage com outro depende, entre outros, da energia de superfície. O principal requerimento para uma forte adesão é o estado de energia da superfície, quanto maior esta for, maior será a receptividade no mecanismo de adesão. O preparo realizado no procedimento restaurador resulta numa superfície de baixa energia de superfície devido aos contaminantes e *smear layer*. A etapa de condicionamento ácido ao removê-los, altera o conteúdo inorgânico da dentina, produzindo microporosidades e maior rugosidade de superfície. Fatores esses que aumentam a molhabilidade, ou seja a extensão pela qual o líquido adesivo interage com a superfície sólida do substrato, e a energia de superfície (Breschi *et al.*, 2013; S. J. Marshall *et al.*, 2010).

A estratégia *etch-and-rinse* é considerada como o “gold standard” da adesão dentária pela sua previsibilidade (Figura 5) (Milia, Cumbo, Jose A. Cardoso & Gallina, 2012).

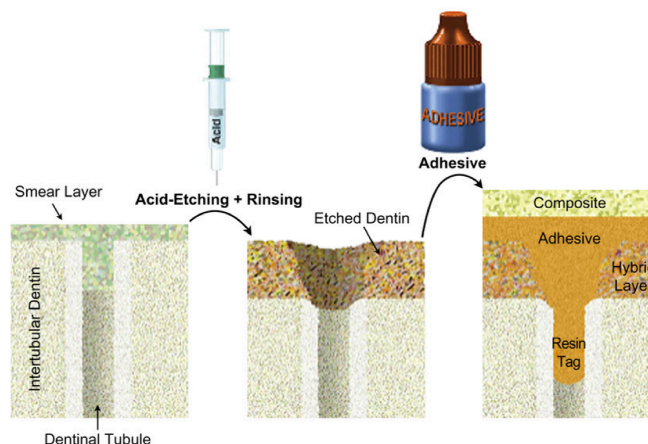


Figura 5 – Protocolo e interação com a dentina de um sistema adesivo *etch-and-rinse* de dois passos (Perdigão, 2007).

O primeiro passo da técnica passa pela aplicação de um gel ácido, usualmente ácido fosfórico, que remove a *smear layer* e os *smear plugs*, desmineralizando a camada mais superficial de cristais de hidroxiapatite em cerca de 3-5 μm , expondo a camada de fibras de colagénio subjacentes (Figura 6) (Cardoso *et al.*, 2011).

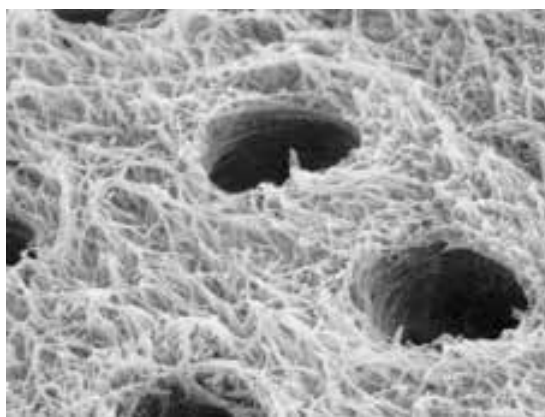


Figura 6 - Imagem por SEM de dentina condicionada com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos. A *smear layer* foi removida, criando uma fina zona desmineralizada com a rede de fibras de colagénio agora expostas (Alex, 2015).

Num segundo passo é aplicado o *primer*, líquido composto por uma mistura de monómeros resinosos (HEMA, por exemplo) dissolvidos num solvente orgânico, geralmente acetona, álcool ou água. Enquanto o HEMA é responsável por aumentar a molhabilidade e promover uma re-expansão da rede de fibras de colagénio, o solvente é

capaz de deslocar água da superfície e assegurar a difusão dos monómeros na dentina desmineralizada. Os monómeros, pelas suas características hidrofílicas, penetram entre as fibras de colagénio da dentina nos espaços preenchidos por água que anteriormente eram ocupados por cristais de hidroxiapatite. Na terceira e última etapa, caso se trate de um sistema de três passos, é aplicado o *bond*, uma resina adesiva livre de solventes que permite a penetração de monómeros hidrofóbicos nos espaços interfibrilares da rede de colagénio e igualmente nos túbulos de dentina. A infiltração da matriz desmineralizada deverá ser o mais completa possível de modo a formar após polimerização um biocompósito hibridizado micromecanicamente retido (Boushell & Sturdevant, 2013; Breschi *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2011; Milia *et al.*, 2012; Perdigão, 2007; Perdigão *et al.*, 2013; Silva e Souza, Carneiro, Lobato, Silva e Souza, & de Góes, 2010).

7. SISTEMAS ADESIVOS *SELF-ETCH*

A adesão pela estratégia *self-etch* foi introduzida no mercado para suplantiar alguns dos problemas experienciados pelos sistemas *etch-and-rinse*. O desenvolvimento dos sistemas adesivos baseia-se cada vez mais na sua simplificação e menor tempo de aplicação. A adesão pela técnica *self-etch* não requer o condicionamento ácido verificado nos sistemas *etch-and-rinse*, uma vez que condicionam e permitem a impregnação dos monómeros adesivos simultaneamente. A maioria destes sistemas adesivos contém um monómero funcional específico, com o intuito de fazer o condicionamento do substrato, aumentar a penetração do mesmo nos tecidos dentários e potencialmente estabelecer uma interação química entre as interfaces, sendo estes fatores que vão determinar a performance adesiva (Milia *et al.*, 2012; Perdigão, 2007).

Os adesivos *self-etch* são apresentados sob o número de passos clínicos a aplicar na técnica, podendo surgir como sistemas adesivos de um ou dois passos. Esta diferenciação depende se o *primer* e a resina adesiva estão apresentados separadamente ou juntos numa única solução (Figura 7) (Van Meerbeek *et al.*, 2011).

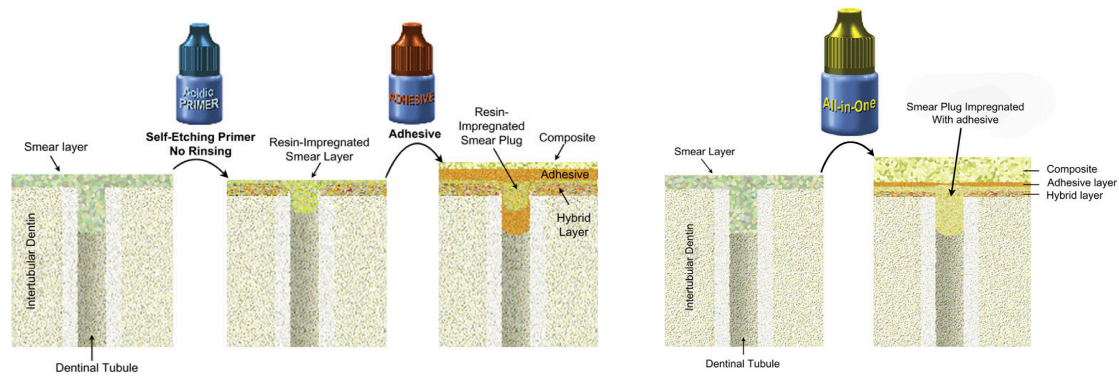


Figura 7 - Protocolo e interação com a dentina de sistemas adesivos *self-etch* de dois passos e *all-in-one* (Perdigão, 2007).

As alterações morfológicas da camada híbrida produzidas pelos sistemas *self-etch* dependem da habilidade dos seus monómeros funcionais e da extensão em que estes desmineralizam o substrato dentário, fator que se deve ao pH das soluções adesivas (Figura 8). De acordo com esta característica, estão divididos em ultra-suaves ($\text{pH} > 2.5$), que por vezes são igualmente referidos como capazes de criar uma nano-interação, pelo facto de estar reportado que o monómero funcional 10-MDP de alguns adesivos se liga ionicamente mediante os grupos fosfato ao cálcio dos cristais de hidroxiapatite e forma uma camada de 4-nm, chamada de nano-camada; suaves ($\text{pH} \approx 2$), moderadamente fortes (pH entre 1 e 2) e fortes ($\text{pH} \leq 1$).

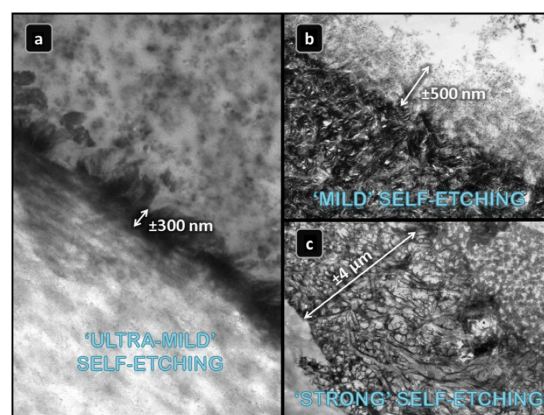


Figura 8 – Imagem por TEM da interface dentina-adesivo de um sistema *self-etch*. A estrutura da interface depende da interação dos monómeros funcionais com o substrato e da acidez do adesivo (Van Meerbeek *et al.*, 2011).

Importa referir que apenas esta última categoria apresenta um comportamento semelhante à estratégia *etch-and-rinse*, que ao interagir a uma profundidade de alguns micrómetros e penetrar em toda a extensão da *smear layer*, forma *resin tags* na dentina.

Em sentido contrário, os adesivos *self-etch* suaves apenas desmineralizam a dentina parcialmente, formando uma camada híbrida de cerca de 1µm, deixando uma quantidade substancial de cristais de hidroxiapatite em redor das fibras de colagénio. O remanescente disponível pode promover uma interação química adicional, que associada à adesão micromecânica pode ser vantajosa em termos de efetividade e durabilidade (Cardoso *et al.*, 2011; Van Meerbeek *et al.*, 2011).

A desmineralização e infiltração simultânea verificadas nestes adesivos resultam numa redução do número de passos clínicos a efetuar e consequentemente menor tempo de aplicação em comparação com os sistemas *etch-and-rinse*, bem como em menor sensibilidade pós-operatória pela incorporação da *smear layer* e *smear plugs* na camada híbrida (Figura 9) (Milia *et al.*, 2012).

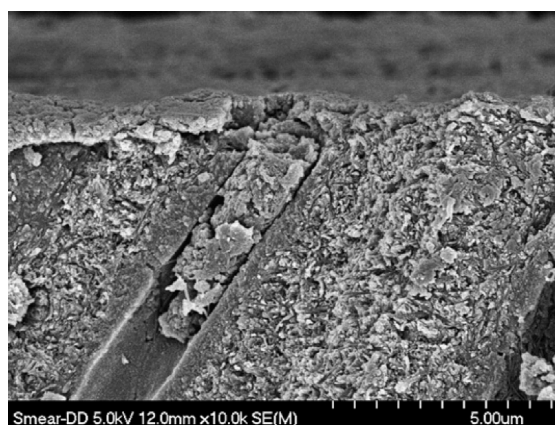


Figura 9 - Imagem por FESEM de *smear layer* e *smear plug* na dentina (Perdigão, 2007).

8. SISTEMAS ADESIVOS UNIVERSAIS OU MULTI-MODO

Com a queda da patente da molécula 10-MDP foi lançada no mercado uma nova geração de sistemas adesivos com potencial de adesão química. Estes novos sistemas adesivos são chamados universais ou multi-modo pela versatilidade de utilização, podendo ser aplicados pela estratégia *etch-and-rinse*, *self-etch* ou ainda pela técnica *selective-etching* mediante o condicionamento seletivo do esmalte (Figura 10) (Sezinando, 2014). Deste modo, os adesivos universais são o resultado das exigências clínicas atuais, tornando o procedimento adesivo mais rápido e menos sensível à técnica

utilizada, permitindo ao profissional a escolha da estratégia de aplicação (Chen *et al.*, 2015).

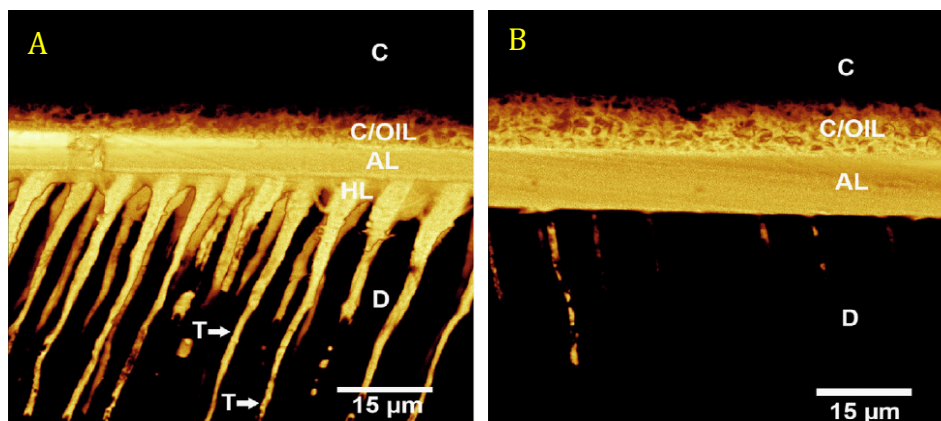


Figura 10 - Imagens por CLSM do adesivo universal All-bond Universal (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) nas estratégias *etch-and-rinse* (A) e *self-etch* (B) (Wagner, Wendler, Petschelt, Belli & Lohbauer, 2014).

Este recente tipo de sistemas adesivos deve ser capaz de interagir com diferentes substratos, apresentar características hidrofílicas que permitam humedecer a dentina e ao mesmo tempo ser hidrofóbicos após polimerizados, de modo a retardar o processo de absorção de água e consequente degradação da interface adesiva por hidrólise (Alex, 2015).

A interação química é uma característica crucial destes novos sistemas adesivos de modo a aumentar a durabilidade da interface dentina-resina (Sezinando, 2014).

Alguns estudos demonstram que monómeros funcionais como o 10-MDP, podem interagir quimicamente com os cristais de hidroxiapatite mediante o conceito adesão-descalcificação. Este monómero funcional tem sido associado a uma melhor resistência da interface adesiva à degradação através da prevenção de micro e nanoinfiltração. Segundo este conceito, após a interação química do monómero funcional com os íons cálcio da hidroxiapatite, ocorrem duas hipóteses. Numa primeira possibilidade a ligação iónica criada é hidroliticamente estável, resultando num sal cálcio-monómero que pode ser co-polimerizado na resina adesiva, ou surge uma ligação instável que resulta em descalcificação pela libertação de fosfato e cálcio da hidroxiapatite (Silva e Souza *et al.*, 2010; Yoshida & Inoue, 2012; Yoshihara *et al.*, 2010).

A molécula 10-MDP trata-se de um versátil monómero funcional anfipático, ou seja, apresenta um grupo terminal metacrilato hidrofóbico capaz de se ligar quimicamente a materiais restauradores e cimentos, e um grupo terminal fosfato de carácter hidrofílico

com propriedades adesivas químicas aos substratos dentários, metais e zircónia. Estas características são alcançadas nos substratos dentários pela interação iónica do monómero com os iões cálcio da hidroxiapatite, formando sais de cálcio-10-MDP quimicamente interligados e hidroliticamente estáveis numa nano-camada estabelecida. O facto deste monómero funcional ser o mais hidrofóbico de todos os monómeros utilizados nos adesivos dentários, permite-lhe desempenhar um papel de relevo quanto à durabilidade e estabilidade da interface adesiva (Alex, 2015; Sezinando, 2014).

9. FATORES QUE COMPROMETEM A ESTABILIDADE DA INTERFACE ADESIVA NA DENTINA

A adesão à dentina, pela sua imprevisibilidade, é considerada como mais susceptível à degradação. Dois grandes mecanismos estão envolvidos na degradação da interface adesiva ao longo do tempo. Um mecanismo consiste na degradação hidrolítica causada pela sorção de água promovida pelas características hidrofílicas dos sistemas adesivos contemporâneos, sendo o outro da responsabilidade de enzimas endógenas com atividade proteolítica ativadas no processo adesivo (Liu *et al.*, 2011).

O protocolo adesivo, independentemente da sua estratégia, combina características hidrofílicas e hidrofóbicas, pelo que a presença de zonas desmineralizadas não infiltradas pelos monómeros adesivos hidrofóbicos, deixam uma camada resinosa não difundida com comportamento semipermeável que permite a passagem de água ao longo da interface adesiva ainda que polimerizada. Pelo facto da degradação hidrolítica da camada híbrida ocorrer apenas na presença de água, as características hidrofílicas dos sistemas adesivos, absorção de moléculas de água e consequente degradação, estão frequentemente relacionadas (Breschi *et al.*, 2008; Dantas *et al.*, 2008).

10. DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DA CAMADA HÍBRIDA

10.1. Degradação Hidrolítica por Sorção de Água

Segundo Liu *et al.* (2011), a adesão à dentina devido ao seu conteúdo orgânico é menos durável que a adesão ao esmalte.

A adesão da interface resina-dentina é considerada uma forma de engenharia tecidual, cujo objetivo passa pela completa infiltração e encapsulação das fibras de colagénio expostas no substrato desmineralizado que servirão como uma estrutura protetora e estabilizadora da interface à degradação. Essa estabilidade adesiva depende da formação de uma camada híbrda compacta e homogênea, composta por matriz orgânica da dentina, cristais residuais de hidroxiapatite, monómeros resinosos e solventes, sendo que a sua longevidade clínica depende de processos físicos e químicos. A sua estabilidade é afetada em termos físicos pelas forças oclusais durante a função mastigatória e o *stress* da contração e expansão causado pelas mudanças de temperaturas na cavidade oral. A saliva, alimentação e os bioprodutos bacterianos desafiam igualmente a interface adesiva, resultando na degradação de fibras de colagénio expostas e eluição dos monómeros adesivos (Figura 11) (Ferreira, Pires, Oliveira, Silva & Melo, 2012; Liu *et al.*, 2011).

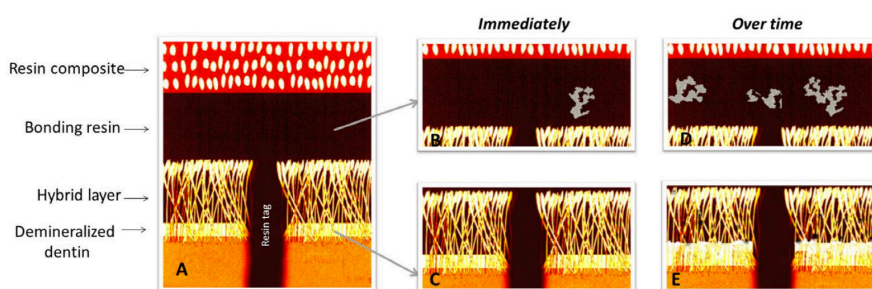


Figura 11 - Esquema representativo da degradação da interface adesiva ao longo do tempo mediante a presença de depósitos de nitrato de prata indicando a presença de água e/ou solvente retidos bem como áreas inadequadamente polimerizadas (Perdigão *et al.*, 2013).

De modo a criar uma adequada camada híbrda é importante que a superfície de dentina exposta se apresente húmida, evitando o colapso das sensíveis fibras de colagénio que serão encapsuladas pelos monómeros adesivos. Contudo, o oposto também afeta negativamente o resultado adesivo a longo prazo, pelo efeito da degradação hidrolítica (Ferreira *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2011).

Os sistemas adesivos contemporâneos apresentam um balanço químico entre monómeros hidrofílicos (HEMA, por ex.) e hidrofóbicos (Bis-GMA, por ex.) que tornam permeável a superfície de dentina humedecida (Chimeli *et al.*, 2014).

A formação adequada da camada híbrida depende portanto do solvente, sendo este componente aquele que atua como transportador dos monómeros pela rede de fibras de colagénio (Ferreira *et al.*, 2012).

Este complexo balanço hidrofílico/hidrofóbico, a água e o solvente tornam o adesivo propenso à separação de fases, o que pode prejudicar a eficácia adesiva (Chimeli *et al.*, 2014; Van Landuyt *et al.*, 2005).

A incorporação do HEMA na composição torna-o hoje no monómero hidrofílico mais frequente nos sistemas adesivos. Devido ao seu baixo peso molecular atua como co-solvente, aumentando a miscibilidade dos componentes hidrofóbicos e hidrofílicos em solução. Todavia, a adição deste monómero ao aumentar a natureza hidrofílica da interface traz igualmente as suas desvantagens, dado que vai tornar a união mais susceptível aos mecanismos de degradação hidrolítica (Felizardo *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011).

Atualmente, a tendência passa pela diminuição do uso de monómeros extremamente hidrofílicos como o HEMA e substituí-los por monómeros como UDMA ou TEGDMA (Silva e Souza *et al.*, 2010).

10.2. Degradação Hidrolítica por Proteases Endógenas

Gross & Lapiere (1962) descreveram uma atividade observada com capacidade de degradação de colagénio. Estudos recentes reportaram a presença, papel e função de enzimas endógenas com atividade collagenolítica na camada híbrida (Tjäderhane *et al.*, 2013). Estas observações referem-se a uma nova família enzimática, as metaloproteinases (MMPs), collagenases endógenas capazes de degradar a tripla hélix do colagénio.

Pesquisas nas proteínas não collagenolíticas da dentina, demonstraram que as fibras de colagénio presentes no substrato apresentam pró-formas inativas de enzimas proteolíticas denominadas de metaloproteinases. Estas têm sido identificadas quer nos odontoblastos quer na dentina mineralizada ou desmineralizada, e como tendo papel de relevo na degradação da interface adesiva (Perdigão *et al.*, 2013).

Pashley *et al.* (2004) demonstraram a primeira evidência do envolvimento de MMPs na degradação da matriz de dentina condicionada na ausência de bactérias.

As MMPs fazem parte de uma família de mais de 20 enzimas proteolíticas endógenas, uma classe de endopeptidases cálcio e zinco dependentes capazes de degradar proteínas da matriz extracelular. As MMPs poderão estar presentes na saliva, polpa ou sequestradas em toda a extensão da dentina, aparecendo com maior intensidade ao longo da junção amelo-dentinária e pré-dentina. Várias formas inativas de MMPs têm sido identificadas em dentina mineralizada, entre elas, a collagenase MMP-8 e as gelatinases MMP-2 e MMP-9, tendo estas duas últimas sido detetadas com elevada atividade na porção basal da camada híbrida (Moon, Weaver & Brooks, 2010; Perdigão *et al.*, 2013; Tjäderhane *et al.*, 2014).

As MMPs têm um papel chave em várias doenças orais. A forma MMP-8 é conhecida pelo seu envolvimento na doença periodontal e a MMP-20 com influência no desenvolvimento de fluorose dentária e amelogenese imperfeita (Strobel & Hellwig, 2014).

Sendo secretadas por células do tecido conjuntivo como fibroblastos, osteoblastos e odontoblastos, sob a forma de zimogénios, uma forma inativa ou pró enzima, a ativação das pró-formas enzimáticas é um processo dinâmico e complexo tendo sido sugeridos vários mecanismos (Moon *et al.*, 2010).

A maioria das MMPs são sintetizadas e libertadas pelos odontoblastos sob a sua pró-forma inativa, requerendo para a ativação da sua atividade catalítica a ligação de iões cálcio e zinco num domínio catalítico ativo à união de iões zinco (Zhang & Kern, 2009). Estas pró-MMPs ficam sequestradas na dentina durante a sua formação, e podem ser catalisadas na forma ativa após a sua libertação. Este processo pode ser mediado por níveis de pH abaixo de 4.5 (como se verifica em lesões de cárie ou no condicionamento ácido da dentina, provocando a alteração da conformação do pró-péptido e indução do domínio catalítico zinco-dependente), por moléculas de oxigénio reativas, agentes químicos, e ainda por ação de proteínases (Moon *et al.*, 2010; Perdigão *et al.*, 2013; Zhang & Kern, 2009).

Neste último caso, proteínas não-colagenolíticas da matriz de dentina libertadas a níveis baixos de pH, podem ligar-se a MMPs específicas como as pró-formas-2, 3 e 9 e ativá-las aquando da sua libertação (Moon *et al.*, 2010).

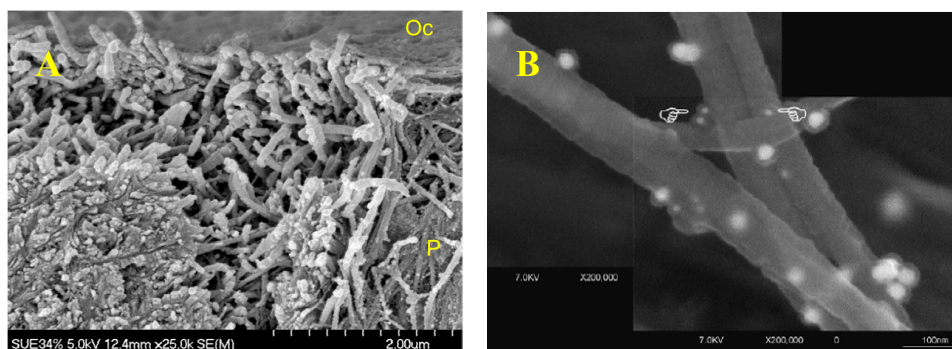


Figura 12 - A. Imagem por SEM da rede de fibras de colagénio após condicionamento ácido e lavagem, os espaços entre as fibras estão agora preenchidos por água. B. Imagem por FESEM da morfologia de uma fibra de colagénio tipo I na dentina (Breschi *et al.*, 2008; Perdigão *et al.*, 2013).

A completa infiltração dos monómeros é essencial ao sucesso adesivo. Caso não se verifique, o colagénio exposto e desprotegido é susceptível à degradação, tornando a camada híbrida instável e a interface adesiva sujeita a nanoinfiltração (Figura 12). As metaloproteinases são expostas e ativadas por agentes ácidos no decorrer do procedimento adesivo independentemente da estratégia aplicada, e podem degradar lentamente as fibras de colagénio tipo I da interface adesivo-dentina (Figura 13) (Duarte, Perdigão & Lopes, 2006; Perdigão *et al.*, 2013; Zhang & Kern, 2009).

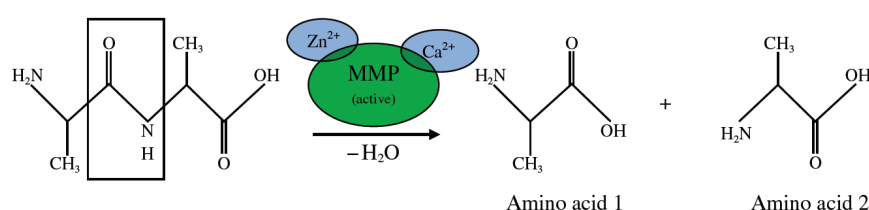


Figura 13 - Representação esquemática da degradação da matriz de colagénio mediante a clivagem peptídica por MMPs (Strobel & Hellwig, 2014).

Tal como a infiltração imperfeita do substrato dentinário, a presença de água é outro aspeto indispensável para a função hidrolítica das metaloproteinases, dado que pertencem à família das hidrolases. Nas interfaces instáveis ocorre ao longo do tempo, a eluição dos monómeros nos canais de nanoinfiltração, expondo a rede de fibras de colagénio, agora mais susceptíveis à hidrólise proteolítica. O colapso da rede de colagénio pode aumentar o conteúdo em água e induzir os processos hidrolíticos, comprometendo a longevidade da restauração adesiva (Zhang & Kern, 2009). Facto que pode justificar a razão da degradação da camada híbrida na adesão à dentina após 6 meses de armazenamento em água (Dantas *et al.*, 2008).

Contudo, quando a matriz de dentina está mineralizada, as MMPs ficam cobertas por nanocristais de hidroxiapatite, tornando-as imóveis e inativas. O que sugere que enquanto a matriz se encontrar mineralizada, as suas proteases manter-se-ão estruturalmente estáveis (Mazzoni *et al.*, 2013).

A atividade destas enzimas é inibida por inibidores tecidulares de metaloproteinases endógenos, denominados TIMPs, sendo o balanço entre estes de extrema importância na remodelação da matriz extracelular dos tecidos (Perdigão *et al.*, 2013).

É consensual que as MMPs têm papel de relevo nos processos de desenvolvimento dentário, bem como na evolução da cárie e degradação da interface resina-dentina formada no procedimento adesivo (Perdigão *et al.*, 2013; Zhang & Kern, 2009).

Inibidores de proteases utilizados como *primers* adicionais poderão ser um passo na inibição da atividade colagenolítica intrínseca da dentina, no retardar dos processos de degradação e no aumento da estabilidade das fibras de colagénio da camada híbrida (Zhang & Kern, 2009).

Novas estratégias preventivas de degradação adesiva à dentina podem ser cruciais no aumento das perspetivas de longevidade das restaurações adesivas. O uso de inibidores exógenos como a clorhexidina poderá ser uma estratégia eficaz nesse sentido (Perdigão *et al.*, 2013).

11. CLORHEXIDINA

A clorhexidina é uma biguanida catiónica (Figura 14) com amplo espectro antimicrobiano face a microrganismos orais, que mediante a sua concentração apresenta efeitos bacteriostáticos ou bactericidas e tem sido extensivamente utilizada nas vertentes da periodontologia e endodontia (Perdigão *et al.*, 2013; Sabatini & Pashley, 2014).

Entre o amplo horizonte de aplicações da clorhexidina, um de especial interesse atual insere-se na dentisteria adesiva e o seu papel na estabilização da matriz orgânica da interface resina-dentina (Singh, Dhillon, Kapoor & Kaur, 2014).

Antes de ser testada como um potencial inibidor da atividade de MMPs no campo da adesão dentária, a clorhexidina foi inicialmente aplicada como desinfetante cavitário antes da aplicação do adesivo (Franco *et al.*, 2007; Perdigão *et al.*, 2013).

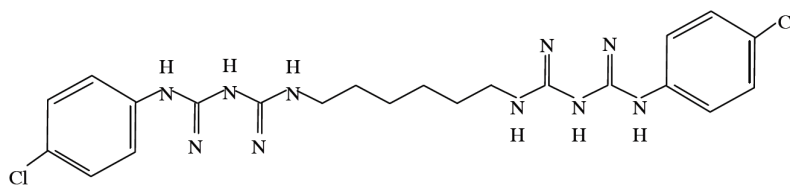


Figura 14 - Fórmula estrutural da molécula de clorhexidina (Strobel & Hellwig, 2014).

A evidência científica desta nova descoberta foi comprovada por Pashley *et al.* (2004), que demonstrou o seu papel inibitório de MMPs e a possibilidade de preservação da camada híbrida na dentina.

Também ficou demonstrado por Hebling, Pashley, Tjäderhane & Tay (2005), que o uso de clorhexidina como inibidor de metaloproteinases pode desacelerar a degradação da camada híbrida *in vivo*.

A eficiência clínica desta molécula como agente antimicrobiano ou antiproteolítico é atribuída à sua substantividade. Devido à natureza catiónica, a clorhexidina pode ligar-se a superfícies com a presença de proteínas ácidas e ver a sua ação prolongada no tempo pela constante libertação a níveis terapêuticos no sítio onde foi aplicada. Esta propriedade de forte união à matriz inorgânica e orgânica da dentina, pode ser explicada pela formação de sais de fosfato aquando da sua interação com a hidroxiapatite e pela forte ligação estabelecida com o colagénio do tipo I da matriz orgânica (M. R. Carrilho *et al.*, 2011; Sabatini & Pashley, 2014; Singh *et al.*, 2014).

A clorhexidina apresenta fortes cargas catiónicas que se creem ligar aos grupos fosfato em dentina mineralizada e aos grupos carboxilo no substrato desmineralizado, possuindo por isso uma forte afinidade para com os substratos dentários (Sabatini & Pashley, 2014).

Segundo Perdigão *et al.* (2013), as fibras de colagénio caso não sejam devidamente envolvidas pela resina adesiva estão sujeitas à ação hidrolítica das MMPs, todavia após aplicação de clorhexidina, a rede de fibras de colagénio mantém a sua estrutura estável, não se verificando a mesma integridade quando esta etapa não é realizada, tendo como consequência uma progressiva degradação (Zhang & Kern, 2009).

A ativação e função das MMPs está dependente de iões Ca^{2+} e Zn^{2+} , por sua vez, a clorhexidina atua como inibidor destas enzimas alterando a sua conformação tridimensional pela depleção destes mesmos iões metálicos essenciais à sua atividade (Figura 15) (Strobel & Hellwig, 2014).

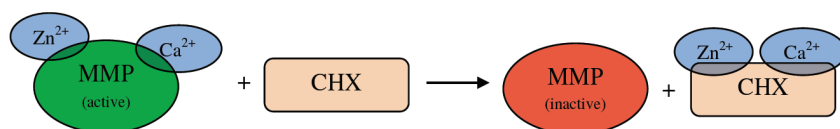


Figura 15 - Representação esquemática da ação da clorhexidina sobre as MMPs (Strobel & Hellwig, 2014).

Do ponto de vista clínico e mediante o potencial químico que apresenta na união aos compostos inorgânicos e orgânicos da dentina, a clorhexidina é aplicada topicamente sob a forma de solução aquosa (Figura 16) ou em gel depois do condicionamento ácido do substrato e previamente ao adesivo ou surgindo incorporada na composição de condicionadores acídicos e sistemas adesivos (Perdigão *et al.*, 2013; Sabatini & Pashley, 2014; Singh *et al.*, 2014).

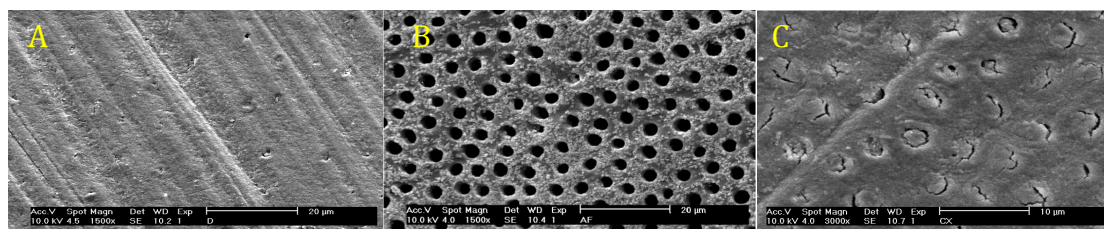


Figura 16 - A. Superfície em dentina após instrumentação; B. Superfície após condicionamento com ácido fosfórico a 37% durante 15 segundos; C. Superfície após aplicação de digluconato de clorhexidina a 2% (Bengtson, Bengtson, Bengtson & Turbino, 2008).

Deste modo, caso tenha o seu uso visando a preservação da camada híbrida e o aumento da estabilidade a médio/longo prazo, a concentração aplicada deverá ser igual ou superior a 0,1%, sendo utilizada na área da investigação usualmente a 0,2 e 2% (Miranda, Silva, Vieira & Costa, 2014; Montagner, Sarkis-Onofre, Pereira-Cenci & Cenci, 2014).

12. TESTES DE RESISTÊNCIA ADESIVA

12.1. Norma ISO/TS 11405

A norma ISO/TS 11405: 2015 é uma norma específica que fornece orientações de como se devem realizar testes de adesão entre materiais dentários restauradores e a estrutura dentária, nomeadamente, testes de resistência de união (tração e cisalhamento), testes de medição de fendas marginais e testes de micro e nanoinfiltração.

Esta norma define diversos critérios de seleção de dentes (pré-molares ou molares permanentes humanos hígidos de indivíduos entre os 16 e os 40 anos, extraídos há não mais de seis meses), qual a forma de armazenamento ideal (limpeza e remoção de tecidos e sangue aderidos, conservando de seguida em água destilada ou cloramina tri-hidratada 0,5% por um período máximo de uma semana), as indicações na preparação da superfície do dente, a aplicação do adesivo e o procedimento de realização do teste de microtração.

12.2. Testes de Microtração

A avaliação da interface adesiva, recorre diversas vezes à determinação da sua resistência. Muitas dúvidas se colocam quanto ao método mais efetivo da sua quantificação, o que motivou durante a última década uma enorme evolução na metodologia. Esta culminou com o desenvolvimento dos testes micro-adesivos, baseada na ideia de que melhores resultados poderão ser obtidos com espécimes de menores dimensões, colmatando desta forma as lacunas dos testes macro (Figura 17) (Eckert & Platt, 2007).

Pelo facto da área adesiva ser reduzida ao máximo de 3 mm², está evidenciado que espécimes com menores dimensões são mais fiáveis devido à menor probabilidade de defeitos de tamanho entre amostras (Sirisha, Rambabu, Shankar & Ravikumar, 2014b).

Vários estudos sugerem que a adequada área transversal para testes deverá não exceder os 1.5mm² e não ser inferior a 0.5mm² (Hamouda, Samra & Badawi, 2011).

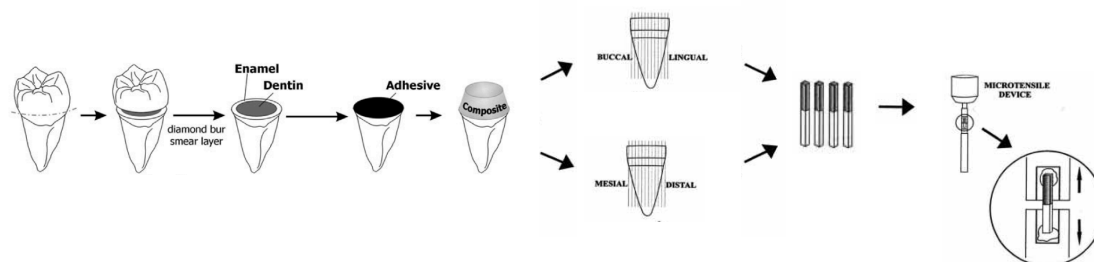


Figura 17 - Esquema representativo do teste de microtração. (Adaptado de: Castro, Andrade, Duarte Júnior, Vaz & Ahid, 2003; De Munck *et al.*, 2005)

Diversas vantagens estão associadas aos testes de microtração. Uma delas passa pelo melhor aproveitamento das amostras dentárias, pelo facto de um dente originar múltiplas micro-amostras sob a forma de palitos. Proporciona igualmente um controlo mais eficaz da região a ser testada, quer seja esmalte, dentina e dentro desta, dentina periférica ou central, e ainda uma melhor distribuição do *stress* das cargas aplicadas na interface. O envelhecimento das amostras por armazenamento em água é acelerado devido à menor distância de difusão. A menor área de superfície facilita a observação microscópica e identificação do tipo de falha adesiva, sendo outra das inúmeras vantagens deste método. Contudo tem as suas limitações e desvantagens, sendo disso representativa a dificuldade de obtenção de amostras geometricamente consistentes, a potencial desidratação e fratura destas, bem como as exigências técnicas associadas à sensibilidade do manuseio e as variáveis implícitas nas amostras como as propriedades individuais de cada substrato e a sua preparação (Armstrong *et al.*, 2010; Sirisha *et al.*, 2014b).

Como referido, o teste de resistência adesiva ideal deverá ser preciso, clinicamente fiável e o menos sensível à técnica e operador. A norma ISO No. 11405 é portanto uma norma específica para a investigação no campo da adesão, providenciando um guia para a seleção do substrato, armazenamento, manuseio de amostras dentárias e características dos variados testes de resistência adesiva, de modo a garantir um padrão standardizado de qualidade e fiabilidade (Sirisha, Rambabu, Shankar & Ravikumar, 2014a).

A força de resistência adesiva mediante este teste é calculada pela divisão da força de tensão aplicada no momento de fratura (N) pelo valor da área transversal da interface adesiva (mm²) (Armstrong *et al.*, 2010).

13. ENVELHECIMENTO DE AMOSTRAS

13.1. Envelhecimento por Termociclagem

As restaurações adesivas intra-orais estão continuamente sujeitas a forças de *stress* pelos dentes oponentes, que ao longo do tempo tem os seus efeitos prejudiciais na resistência adesiva, e que em associação com os efeitos da sorção de água pelos constituintes dos sistemas adesivos são um fator de relevo, podendo coadjuvar nos processos de degradação das interfaces adesivas (Amaral, Colucci, Palma-Dibb, & Corona, 2007; Dantas *et al.*, 2008).

A Termociclagem é um método frequentemente utilizado na simulação das condições do ambiente intra-oral em laboratório. Este método, mediante ciclos com alterações da temperatura, permite uma indução repetitiva do *stress* de contração/expansão na interface adesiva resultante das características intrínsecas das resinas compostas. Este método permite portanto um incremento da velocidade dos processos de hidrólise das fibras de colagénio desprotegidas, motivados pelas elevadas temperaturas e pela remoção dos monómeros não devidamente polimerizados. Desse modo, a repetição consecutiva dos efeitos de contração/expansão verificadas na termociclagem proporciona a formação de forças de *stress* semelhantes às condições *in vivo* com a formação de *gaps* na interface que permitem a passagem de fluídos. Alterações no tamanho destas falhas podem resultar no movimento de fluídos e criar zonas de nanoinfiltração nas margens mais vulneráveis da área adesiva (Amaral *et al.*, 2007; Daneshkazemi *et al.*, 2013).

A frequência de ciclos verificados na cavidade oral continua por determinar, contudo é proposto que se verifiquem entre 20 e 50 ciclos por dia, estabelecendo por essa lógica que 10.000 ciclos corresponderão a um ano de atividade *in vivo*, tendo a norma ISO 11405 estipulado que 500 ciclos seria o número mínimo de ciclos aplicados a investigações na área da adesão dentária (Daneshkazemi *et al.*, 2013; Gale & Darvell, 1999).

II. OBJETIVOS E HIPÓTESES DE ESTUDO

Objetivos

Avaliar *in vitro* a resistência adesiva de um novo sistema adesivo universal.

Avaliar *in vitro* a influência da aplicação de clorhexidina como complemento do protocolo adesivo de um sistema adesivo universal nas vertentes *etch-and-rinse* e *self-etch* na dentina, e na resistência adesiva imediata e após termociclagem.

Hipóteses de Estudo

Hipóteses Nulas

Não há diferenças nos valores de resistência adesiva à dentina do sistema adesivo universal independentemente da estratégia utilizada.

A aplicação de clorhexidina como parte do protocolo de um sistema adesivo universal ou multi-modo não influencia a resistência adesiva à dentina *in vitro*.

Hipóteses Alternativas

Há diferenças nos valores de resistência adesiva à dentina do sistema adesivo universal, independentemente da estratégia utilizada.

A aplicação de clorhexidina como parte do protocolo de um sistema adesivo universal ou multi-modo influencia a resistência adesiva à dentina *in vitro*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo obteve aprovação pela comissão de ética do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM) (Anexo 1).

Foram selecionados 32 dentes molares humanos hígidos extraídos por razões ortodônticas e/ou periodontais, doados pelo banco de Dentes Humano da Clínica Dentária Universitária Egas Moniz, seguindo os seguintes critérios:

- Dentes de indivíduos com idades compreendidas entre os 16 e os 40 anos;
- Livres de cáries;
- Extraídos há não mais de 6 meses.

Aquando da extração dos dentes, estes foram lavados com água corrente de modo a eliminar sangue e tecidos aderidos, tendo sido após estes passos armazenados em água destilada a 4°C segundo a norma ISO 3696. A amostra foi desinfetada mediante solução de cloramina T-trihidratada a 0,5% a 4°C durante o período máximo de uma semana (ISO 11405:2015). Posteriormente foi realizada com acesso a curetas a limpeza dos restantes tecidos orgânicos aderidos. Após o processo de desinfecção e limpeza, a amostra foi armazenada novamente em água destilada a 4°C para posterior análise.

A divisão aleatória dos dentes por cada um dos 8 grupos experimentais (n=4) foi concebida consoante o protocolo adesivo utilizado (*etch-and-rinse* ou *self-etch*), a aplicação ou não de digluconato de CHX 2% e o tempo de envelhecimento (imediato a 24h ou após termociclagem) (Figura 18).



Figura 18 – Exemplo de dentes selecionados para o teste

A seguinte tabela identifica o material utilizado, com as respectivas composições, lotes e validades:

Material	Composição	Lote	Validade	Imagem
All-Bond Universal® Adhesive (Bisco Inc. Schaumburg, IL, USA)	Bis-GMA, etanol, 10-MDP, HEMA, água, iniciadores	1400006042	2016-08	
Ácido Fosfórico Select HV Etch (Bisco Inc. Schaumburg, IL, USA)	Ácido fosfórico 35%	1500005055	2018-05	
Clorhexidina S (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil)	Digluconato de Clorhexidina a 2%	050315	2017-03	
Resina Composta Filtek™ Z250 (3M ESPE, St Paul, MN, USA)	Zircônia/ Sílica, Bis-GMA, TEGDMA	N662931	2018-02	

Tabela 1 - Material utilizado

Cada amostra foi colada longitudinalmente com cola quente ao dispositivo de fixação do micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers, Dinamarca) de modo a realizar dois cortes com uma lâmina de diamante a baixa velocidade sob irrigação, que permitam a seção de interesse. O primeiro paralelamente à face oclusal, com o intuito de remover a camada superficial de esmalte e expor dentina, e o segundo abaixo da junção amelo-cimentária de modo a separar as raízes da porção coronária (Figura 19).

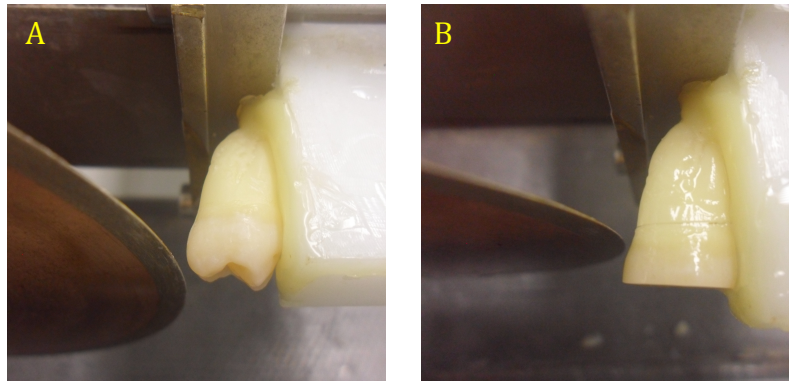


Figura 19 – A. Dente pronto para corte; B. Dente após os cortes

O tecido pulpar foi removido, sendo o espaço remanescente da câmara pulpar preenchido com cola de cianoacrilato (Zapit, Dental Ventures of America, Corona, CA, USA).

Seguidamente a superfície oclusal de cada dente foi submetida a polimento com lixa de SiC (lixa de papel de carboneto de silício) de 600 *grit* (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) durante 60s sob irrigação, de acordo com a norma ISO 11405 de tal modo que se remova a camada de esmalte remanescente e se obtenha uma camada de dentina homogênea com a formação de *smear layer* relevante para o processo de adesão (Figura 20).



Figura 20 – Polimento sob água corrente com lixa SiC

Concluída a preparação das amostras, foi aplicado o protocolo adesivo segundo as instruções do fabricante, nas variantes *etch-and-rinse* ou *self-etch* e a variação ao protocolo com aplicação de CHX 2% consoante o grupo de teste (Ver tabelas 2 a 6).

A seguinte tabela identifica o protocolo aplicado a cada grupo experimental:

ABU-ER1	- Aplicação do SA All-bond Universal [®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) na vertente <i>etch-and-rinse</i> com condicionamento ácido prévio com ácido fosfórico Select HV Etch a 35% (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) e armazenamento de 24h.
ABU-ER2	- Aplicação do SA All-bond Universal [®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) na vertente <i>etch-and-rinse</i> com condicionamento ácido prévio com ácido fosfórico Select HV Etch a 35% (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) seguida de termociclagem de 10.000 ciclos.
ABU-ER3	- Aplicação de digluconato de CHX a 2% (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) após condicionamento ácido com ácido fosfórico Select HV Etch a 35% (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) e posterior aplicação do SA All-bond Universal [®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) na vertente <i>etch-and-rinse</i> com armazenamento de 24h.
ABU-ER4	- Aplicação de digluconato de CHX a 2% (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) após condicionamento ácido com ácido fosfórico Select HV Etch a 35% (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) e posterior aplicação do SA All-bond Universal [®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) na vertente <i>etch-and-rinse</i> seguida de termociclagem de 10.000 ciclos.
ABU-SE1	- Aplicação do SA All-bond Universal [®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) na vertente <i>self-etch</i> sem condicionamento ácido prévio e armazenamento de 24h.
ABU-SE2	- Aplicação do SA All-bond Universal [®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) na vertente <i>self-etch</i> sem condicionamento ácido prévio seguida

de termociclagem de 10.000 ciclos.

ABU-SE3 - Aplicação de digluconato de CHX a 2% (FGM Produtos Odontológicos, Joinvile, SC, Brasil) sem condicionamento ácido prévio e posterior aplicação do SA All-bond Universal[®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) na vertente *self-etch* com armazenamento de 24h.

ABU-SE4 - Aplicação de digluconato de CHX a 2% (FGM Produtos Odontológicos, Joinvile, SC, Brasil) sem condicionamento ácido prévio e posterior aplicação do SA All-bond Universal[®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) na vertente *self-etch* seguida de termociclagem de 10.000 ciclos.

Tabela 2 - Grupos Experimentais

As seguintes tabelas identificam os protocolos de aplicação dos materiais utilizados nos grupos testados:

All-Bond Universal[®]
(Bisco Inc. Schaumburg, IL, USA)
Protocolo de Aplicação

Técnica *Etch-and-Rinse*

1. Lavar a cavidade abundantemente com jato de água;
2. Condicionamento ácido do esmalte e dentina por 15 segundos;
3. Lavar abundantemente e remover os excessos de água com papel absorvente ou jato de ar, deixando a superfície visivelmente húmida;
4. Dispensar 1 a 2 gotas do adesivo e aplicar duas camadas separadas com microbrush, esfregando a superfície preparada com microbrush durante 10 a 15 segundos por camada, não fotopolimerizando entre cada camada;
5. Evaporar o solvente com jato de ar durante pelo menos 10 segundos, devendo a superfície apresentar-se brilhante e uniforme sem se observar qualquer movimento;
6. Fotopolimerizar por 10 segundos.

Técnica *Self-Etch*

1. Lavar a cavidade abundantemente com jato de água;
2. Remover os excessos de água com papel absorvente ou jato de ar, deixando a superfície visivelmente húmida;
3. Dispensar 1 a 2 gotas do adesivo e aplicar duas camadas separadas com *microbrush*, esfregando a superfície preparada com *microbrush* durante 10 a 15 segundos por camada, não fotopolimerizando entre cada camada;
4. Evaporar o solvente com jacto de ar durante pelo menos 10 segundos, devendo a superfície apresentar-se brilhante e uniforme sem se observar qualquer movimento;
5. Fotopolimerizar por 10 segundos.

Tabela 3 - Instruções do Fabricante All-Bond Universal[®] (Bisco Inc. Schaumburg, IL, USA)

Selective HV Etch
Técnica de Aplicação
1. Aplicar o agente condicionador diretamente na superfície, deixando atuar durante 15 segundos; 2. Enxaguar abundantemente por 5 segundos com sucção.

Tabela 4 - Instruções do Fabricante para Selective HV Etch

Clorhexidina S
Técnica de Aplicação
3. Aplicar durante 60 segundos massajando a superfície aplicada; 4. Secar com leve jato de ar.

Tabela 5- Instruções do Fabricante para Clorhexidina S

Resina Composta Filtek™ Z250 (3M ESPE, St Paul, MN, USA)
Técnica de Aplicação
1. Colocar o material restaurador por incrementos de até 2,5mm; 2. Fotopolimerizar durante 40 segundos.

Tabela 6 - Instruções do Fabricante Filtek™ Z250 (3M ESPE, St Paul, MN, USA)

Em cada amostra foi realizada a restauração com resina composta Filtek Z250 (cor A2, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) com incrementos de 2mm até perfazer 6mm de altura. Entre cada incremento de resina, fotopolimerizou-se 40s com fotopolimerizador Optilux 501 (Kerr Middleton, USA) de intensidade de $600\text{mW}/\text{cm}^2$ (Figura 21).

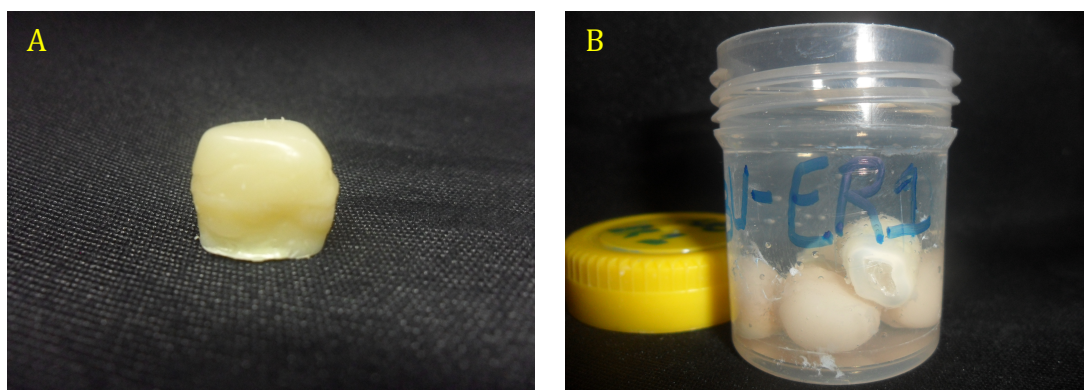


Figura 21 – A. Exemplo de amostra pronta para o teste; B. Grupo de amostras ABU-ER1

As amostras correspondentes aos grupos de teste imediato a 24h (ABU-ER1, ABU-ER3, ABU-SE1, ABU-SE3) foram armazenadas em saliva artificial em recipientes fechados por 24h em estufa de incubação (Memmert INE 400, Memmert, Germany) a 37°C . Os grupos de envelhecimento por termociclagem (ABU-ER2, ABU-ER4, ABU-SE2, ABU-SE4) foram submetidos a 10.000 ciclos em banhos de 30s a 5°C e 55°C , sendo posteriormente armazenados por 24h em saliva artificial em estufa de incubação a 37°C antes do teste de microtração (Figura 22).



Figura 22 – A. Termociclador (Refri 200 E, ARALAB, Parede, Portugal); B. Estufa de incubação (Memmert INE 400, Memmert, Germany)

Para identificar a área correspondente ao esmalte e dentina, marcou-se com caneta de acetato de diferentes cores a superfície de cada amostra.

Após o período de armazenamento/termociclagem, as amostras foram seccionadas em forma de palitos recorrendo a uma lâmina diamantada a baixa velocidade sob irrigação com água destilada no micrótomoto de tecidos duros (Accuton 50, Struers A/S, Ballerup, Denmark) nas direções X e Y, obtendo palitos com seção transversal de $1 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ (Figura 23).

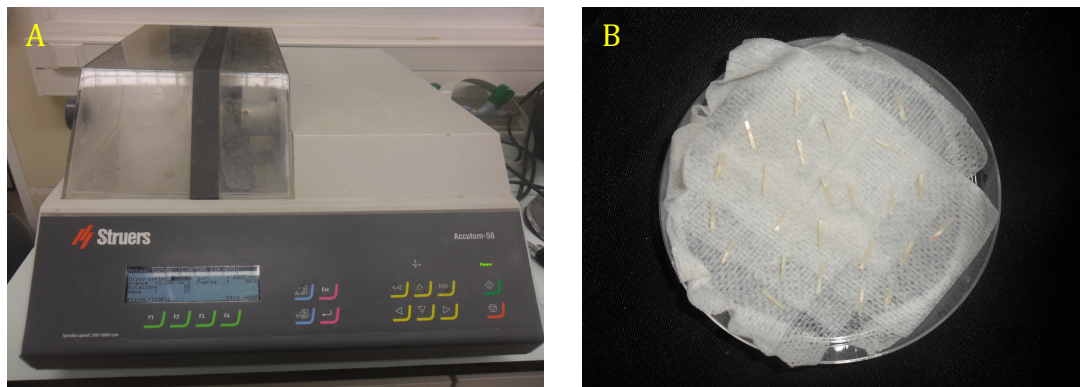


Figura 23 – A. Micrótomoto de tecidos duros (Accuton 50, Struers A/S, Ballerup, Denmark); B. Exemplo de palitos após corte em micrótomoto

Os palitos obtidos foram colados individualmente com cola de cianoacrilato (Zapit, Dental Ventures od America, Corona, CA, USA) a um *jig* de Geraldeli, de aço inoxidável, de modo a testar a resistência adesiva à tração de cada grupo experimental através da máquina de testes universal (Shimadzu AG-50kNI SD MS, Shimadzu Corporation, Kyoto; Japan) a uma velocidade de 0,5 mm/min (Figura 24).

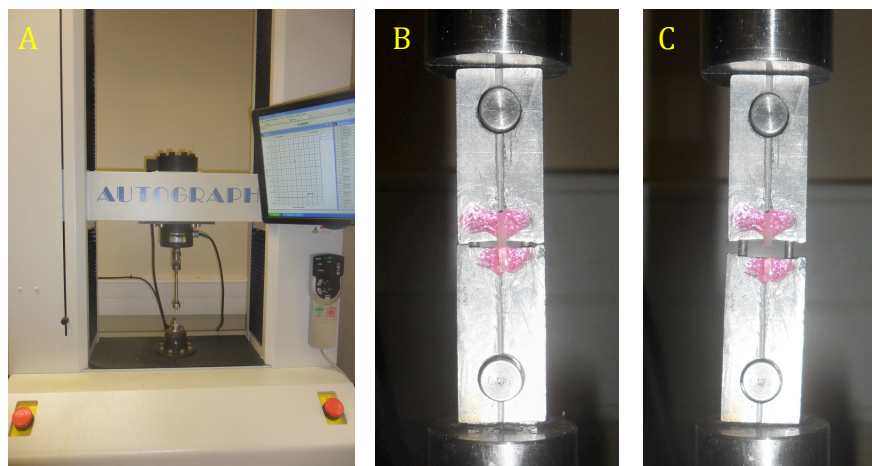


Figura 24 – A. Máquina de Testes Universal (Shimadzu AG-50kNI SD MS, Shimadzu Corporation, Kyoto; Japan); B. *Jig* com palito antes de ser testado; C. Palito após fratura

Após ocorrer fratura dos palitos, foram medidos e registados o comprimento e largura de cada fragmento resultante, mediante craveira digital (Storm Digital Caliper, Pontoglio; Brescia, Itália) (Figura 25), de tal modo que seja traduzida a área aderida em mm^2 . De igual modo registou-se o valor da força em kN no momento de fratura. Como resultado da divisão da força aplicada no momento de fratura (em N) pela área da superfície aderida (em mm^2) obtém-se o resultado da força de adesão (μTBS), expressas em MPa.



Figura 25 - Craveira digital (Storm Digital Caliper, Pontoglio; Brescia, Itália)

Cada fratura foi analisada individualmente por microscópio ótico com ampliação 20x (Leica ATC 2000; Reichert Inc, Buffalo, NY, USA) de modo a avaliar o tipo de fratura:

- Adesiva: Fratura na interface dentina/adesivo;
- Coesiva: Fratura exclusivamente em dentina ou resina composta;
- Mista: Fratura na interface dentina/adesivo incluindo fratura coesiva em dentina ou resina.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi efetuada uma análise estatística inferencial dos resultados, com comparação dos valores médios de força adesiva por aplicação do teste ANOVA One-Way com correção de Brown-Forsythe, pelo facto de se verificar o princípio da normalidade de distribuição de dados, mas não o pressuposto de homogeneidade de variâncias.

De modo a identificar eventuais diferenças com significado estatístico entre valores médios, considerando três ou mais grupos, recorreu-se ao teste de comparação múltipla Post-Hoc de Tamhane.

Nesta análise foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), sendo concretizada com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics v.23 para Mac OS.

IV. RESULTADOS

AVALIAÇÃO DAS FORÇAS ADESIVAS À MICROTRAÇÃO

Grupos Controlo Na Estratégia *Etch-And-Rinse*

Grupo	Protocolo	N	Média (Mpa)	Desvio Padrão
ABU-ER1	Controlo T _{24h}	60	32,21	14,99
ABU-ER2	Controlo c/ TC	58	19,01	9,26

Tabela 7 - Teste ANOVA One-Way: Média em MPa e Desvio Padrão das forças adesivas registadas nos grupos controlo *Etch-and-Rinse*

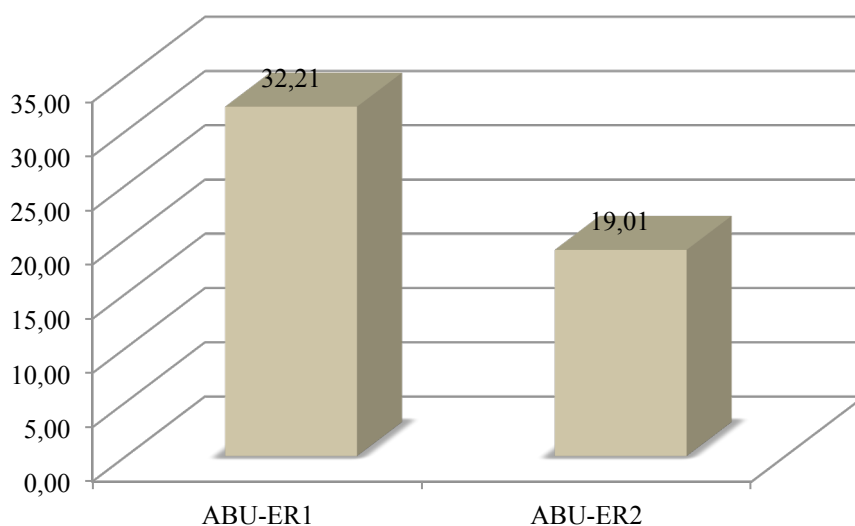


Gráfico 1 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos controlo *Etch-and-Rinse*

A análise do Gráfico 1 demonstra diferenças com significado estatístico ($p = 0,001$, teste Post-Hoc de Tamhane), para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), nos valores de força adesiva entre os grupos ABU-ER1 e ABU-ER2, ou seja, as forças adesivas após envelhecimento por termociclagem na abordagem *etch-and-rinse*, apresentaram uma diminuição significativa quando em comparação com o grupo controlo testado no imediato (T_{24h}).

Grupos Controlo Na Estratégia *Self-Etch*

Grupo	Protocolo	N	Média (Mpa)	Desvio Padrão
ABU-SE1	Controlo T _{24h}	46	19,48	8,64
ABU-SE2	Controlo c/ TC	44	17,67	11,30

Tabela 8 - Teste ANOVA One-Way: Média em MPa e Desvio Padrão das forças adesivas registadas nos grupos controlo *Self-Etch*

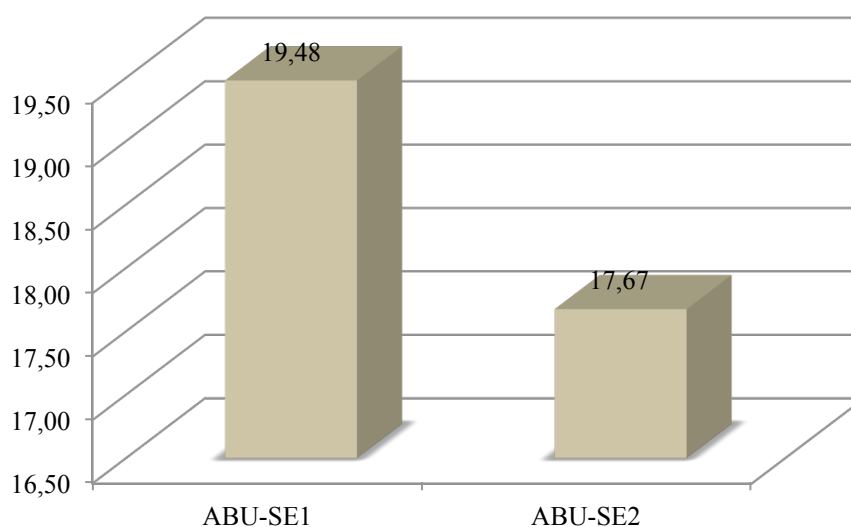


Gráfico 2 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos controlo *Self-etch*

Na análise do Gráfico 2 não se verificam diferenças significativas ($p = 1,000$, teste Post-Hoc de Tamhane), para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) nos valores de força adesiva entre os grupos ABU-SE1 e ABU-SE2, ou seja, as forças adesivas após envelhecimento por termociclagem na abordagem *self-etch*, apresentaram uma estabilidade de valores de força adesiva não verificada na abordagem *etch-and-rinse*.

Grupos Testados Na Estratégia *Etch-And-Rinse*

Grupo	Protocolo	N	Média (Mpa)	Desvio Padrão
ABU-ER1	Controlo T _{24h}	60	32,21	14,99
ABU-ER2	Controlo c/ TC	58	19,01	9,26
ABU-ER3	CHX 2% T _{24h}	61	30,51	11,32
ABU-ER4	CHX 2% c/ TC	78	27,95	11,76

Tabela 9 - Teste ANOVA One-Way: Média em MPa e Desvio Padrão das forças adesivas registadas nos grupos *Etch-and-Rinse*

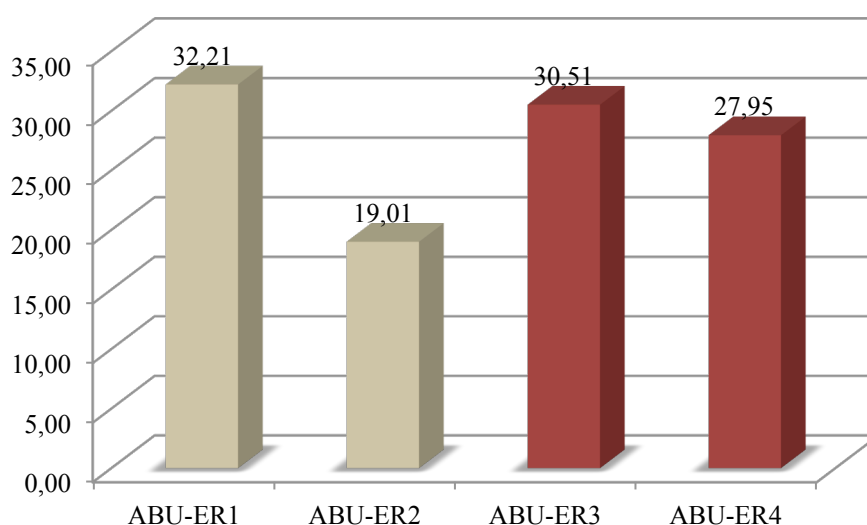


Gráfico 3 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos *Etch-and-Rinse*

Através da análise do Gráfico 3 e mediante análise por teste Post-Hoc de Tamhane verificam-se diferenças significativas ($p = 0,001$), para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) nos valores médios de força adesiva do grupo ABU-ER2 e os registados nos restantes grupos testados. Os grupos ABU-ER1, ABU-ER3 e ABU-ER4 obtiveram valores muito semelhantes ao contrário do grupo controlo sem CHX 2% testado após envelhecimento (ABU-ER2).

Grupos Testados Na Estratégia *Self-Etch*

Grupo	Protocolo	N	Média (Mpa)	Desvio Padrão
ABU-SE1	Controlo T _{24h}	46	19,48	8,64
ABU-SE2	Controlo c/ TC	44	17,67	11,30
ABU-SE3	CHX 2% T _{24h}	74	17,87	9,39
ABU-SE4	CHX 2% c/ TC	66	19,81	10,10

Tabela 10 - Teste ANOVA One-Way: Média em MPa e Desvio Padrão das forças adesivas registadas nos grupos *Self-Etch*

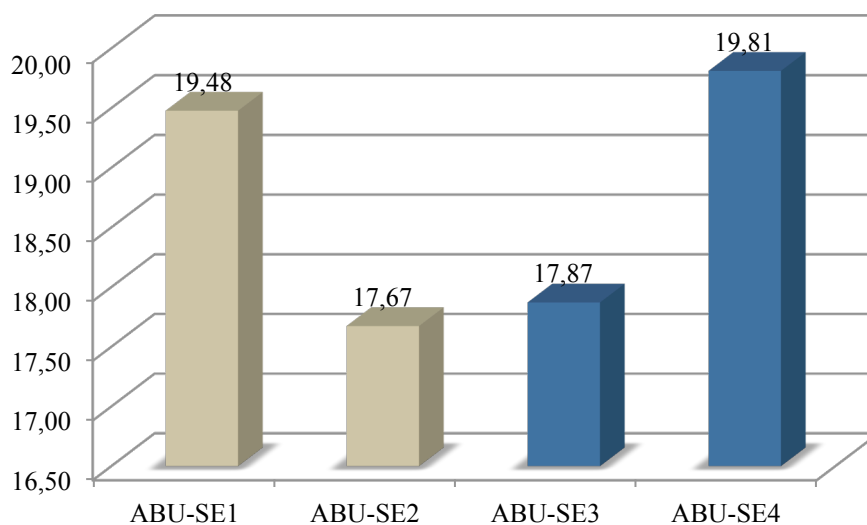


Gráfico 4 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos *Self-Etch*

Por análise do Gráfico 4 e com recurso a teste Post-Hoc de Tamhane, verifica-se uma ligeira diminuição nos valores de força adesiva mas não significativa ($p = 1,000$), para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) nos grupos ABU-SE2 e ABU-SE3 testados sob a estratégia *self-etch*.

Análise De Valores De Força Adesiva À Microtração E Modo De Fratura

Protocolo	Modo <i>Etch-and-rinse</i>		Modo <i>Self-etch</i>	
	T _{24h}	TC	T _{24h}	TC
s/ CHX	32,21 (60)	19,01 (58)	19,48 (46)	17,67 (44)
c/ CHX	30,51 (61)	27,95 (78)	17,87 (74)	19,81 (66)

Tabela 11 –Valores de força adesiva à microtração (MPa) registados e número de amostras nos grupos experimentais

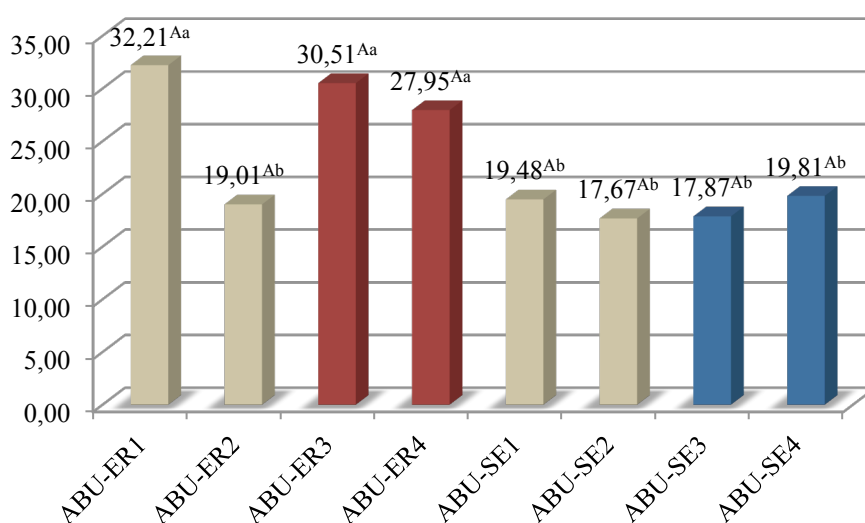


Gráfico 5 - Média em MPa das forças adesivas registadas nos grupos testados. Médias com a mesma sigla indicam não haver diferenças significativas entre grupos ($p > 0,05$).

A análise do Gráfico 5 mediante análise de comparação múltipla por teste Post-Hoc de Tamhane ficam demonstradas diferenças significativas ($p = 0,001$, teste Post-Hoc de Tamhane), para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), nos valores de força adesiva dos grupos testados utilizando a técnica *etch-and-rinse* e os restantes grupos testados onde se realizou a técnica *self-etch*, com exceção do grupo ABU-ER2 ($p = 1,000$) onde se verificou uma acentuada redução de valores de força adesiva após termociclagem.

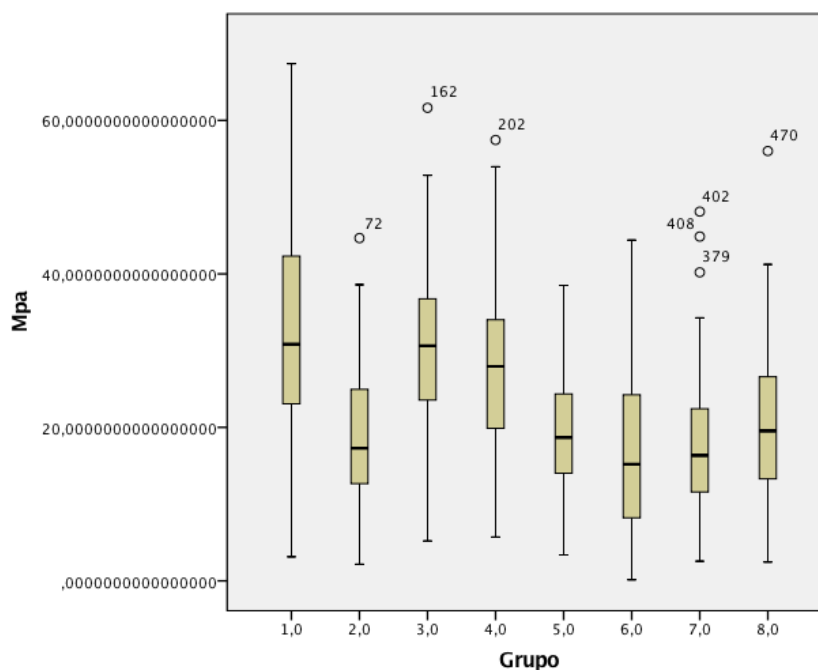


Gráfico 6 - Variância de distribuição dos valores de força adesiva (MPa) nos grupos testados

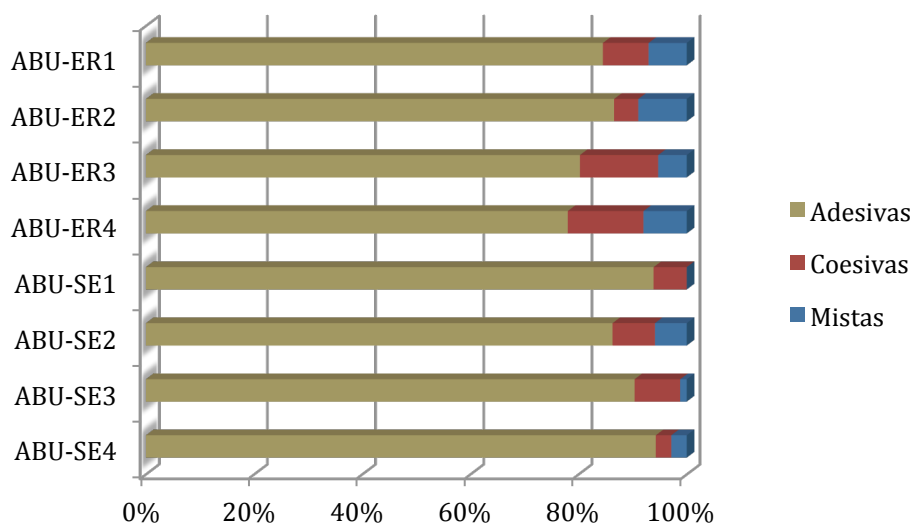


Gráfico 7 - Representação gráfica da distribuição de fraturas verificadas nos grupos testados

A representação de distribuição de fraturas verificadas no teste de microtração pode ser analisada no gráfico 6. Em todos os grupos testados o tipo de fratura predominante foi do tipo adesivo. Os grupos ABU-ER3 e ABU-ER4 foram aqueles onde se registaram maior número de fraturas do tipo coesivo. De referir que a ocorrência de fraturas mistas ocorreu igualmente em maior número nos grupos testados sob o protocolo *etch-and-rinse*.

V. DISCUSSÃO

A área da dentisteria adesiva tem sido revolucionada com contínuos avanços tecnológicos, nomeadamente na adesão à dentina. Está comprovado que embora a adesão imediata seja garantida com eficácia, os resultados adesivos no seu longo termo são afetados adversamente pela sua imprevisibilidade enquanto substrato. Este facto é motivado pelo seu elevado conteúdo em componentes orgânicos, bem como pelas características dos atuais sistemas adesivos independentemente da estratégia utilizada e que em associação comprometem o sucesso adesivo.

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a camada híbrida formada pelos sistemas *etch-and-rinse* apresenta sinais de degradação após um período de 6 meses a 3-5 anos, manifestados pela perda de ligações cruzadas às fibras de colagénio ou pela sorção de água, fatores que estão intimamente ligados entre si (Armstrong *et al.*, 2004; Carrilho *et al.*, 2007).

A evidência científica refere que as fibras de colagénio expostas são alvo de ação proteolítica por enzimas, como as MMP-8, MMP-2 e MMP-9, causando a perda de continuidade entre a camada híbrida e as fibras mineralizadas ancoradas na camada subjacente de dentina. Este facto resulta em zonas vulneráveis à nanoinfiltração, significando um decréscimo significativo de forças de resistência adesiva ao longo prazo (Pashley *et al.*, 2013).

Tal como o protocolo *etch-and-rinse*, os adesivos *self-etch* não estão imunes a este processo. As suas características altamente hidrofílicas aumentam o potencial de atração de água e consequentemente de degradação, que associado à eluição dos monómeros adesivos expõe a rede de colagénio à clivagem por proteases endógenas (Perdigão *et al.*, 2013).

De modo a amplificar o potencial e versatilidade dos sistemas adesivos convencionais, surgiu uma nova geração denominada de adesivos universais ou multimodo. Estes permitem ao clínico a aplicação em ambas as estratégias, o que significa que requerem na sua composição um elemento que permita a ionização dos monómeros hidrofílicos quando aplicado por *self-etch*, a água. As características hidrofílicas destes adesivos fá-los comportarem-se como membranas semipermeáveis, permitindo o movimento de

água na interface resina-dentina e consequente degradação adesiva tal como sucede nos adesivos ditos não universais (Perdigão & Loguercio, 2014).

A degradação hidrolítica por sorção de água parece ser o principal mecanismo de degradação adesiva (De Munck *et al.*, 2009). No entanto, enzimas endógenas com atividade proteolítica como as MMPs são igualmente responsáveis pela hidrólise da matriz de colagénio da camada híbrida ao longo do tempo (Liu *et al.*, 2011; Mazzoni *et al.*, 2013; Sabatini & Pashley, 2014; Strobel & Hellwig, 2014; Tjäderhane *et al.*, 2013, 2014; Zhang & Kern, 2009).

Pelo facto da manutenção da integridade da matriz de colagénio ser essencial para a preservação da interface adesiva na dentina, a procura por mecanismos inibitórios desta atividade proteolítica é um passo necessário para o sucesso e constante evolução da dentisteria adesiva. Nesse sentido, a evidência científica recente tem demonstrado que a aplicação de clorhexidina no protocolo adesivo tem um elevado potencial na inibição destes mecanismos.

Pashley *et al.* (2004), foram pioneiros desta descoberta, demonstrando o papel da clorhexidina na inibição de MMPs e a possibilidade de preservação da camada híbrida na dentina ao longo do tempo. Num estudo seguinte, *in vivo*, foi igualmente comprovado por Hebling, Pashley, Tjäderhane & Tay (2005), que o uso de clorhexidina a 2% como inibidor de metaloproteinases pode desacelerar a degradação da camada híbrida.

Tendo por base estas evidências científicas, este estudo de investigação visa compreender a influência da clorhexidina como complemento do protocolo adesivo, nomeadamente de um sistema adesivo universal nas vertentes *etch-and-rinse* e *self-etch*, com o intuito final de estabelecer novas evidências e vantagens associadas à aplicação desta molécula como inibidor de MMPs na dentina e possíveis benefícios nos resultados adesivos a longo prazo. Deste modo, analisou-se a resistência adesiva à dentina do sistema adesivo universal All-bond Universal[®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) nas vertentes *etch-and-rinse* e *self-etch* a 24h e após termociclagem de 10.000 ciclos, com e sem aplicação de CHX a 2%.

Para a realização da investigação seguiu-se a norma ISO/TS 11405: 2015 que apresenta guias específicas para a correta execução de testes de adesão entre materiais dentários restauradores e as estruturas dentárias. Esta norma define diversos critérios de seleção de dentes, o meio de armazenamento ideal, as indicações na preparação da superfície do dente, a aplicação do adesivo e o procedimento de realização do teste de microtração.

Seguindo a lógica das linhas de orientação da norma ISO/TS 11405:2015, foram selecionados molares humanos hígidos extraídos há não mais de 6 meses, dado que após esse período verificam-se alterações degenerativas nas proteínas dentárias. Por esse facto, o ideal seria a avaliação imediata da resistência adesiva após extração, mas que face a diversos outros fatores como a dificuldade de obtenção de amostras e gestão de tempos de teste de microtração se torna inviável. Assim, os dentes foram armazenados em água destilada a 4°C após lavagem com água corrente, remoção dos tecidos aderidos e desinfecção em cloramina tri-hidratada a 0,5% durante um período máximo de uma semana.

A preparação da superfície dentária após os cortes em micrótomo de tecidos duros (Accutom-50, Struers, Dinamarca) foi realizada sob polimento de lixa SiC de 600 *grit* por 60 segundos sob água corrente de modo a padronizar homogeneamente a *smear layer* em dentina, parâmetro essencial ao estudo adesivo (Luque-Martinez *et al.*, 2014; Manfro, Reis, Loguercio, Imparato & Raggio, 2010; Muñoz *et al.*, 2013; Perdigão *et al.*, 2013; Stanislawczuk *et al.*, 2014; Stanislawczuk, Reis & Loguercio, 2011; Yoshihara *et al.*, 2010).

Quanto ao protocolo adesivo e restaurador, na estratégia *etch-and-rinse* aplicou-se o condicionamento ácido da dentina com ácido fosfórico a 35% por 15 segundos, havendo outros trabalhos de investigação que suportam que este passo pode inclusive diminuir a atividade colagenolítica em 65% em comparação com dentina não desmineralizada (Pashley *et al.*, 2011). No sentido contrário Hanabusa *et al.* (2012) referem que embora a resistência adesiva não seja reduzida, a interface torna-se mais vulnerável à biodegradação.

A concentração de CHX utilizada, caso tenha o seu uso visando a preservação da camada híbrida e o aumento da estabilidade a médio/longo prazo, deverá ser igual ou superior a 0,1%, sendo utilizada na área da investigação usualmente a 0,2 e 2% (Miranda *et al.*, 2014; Montagner *et al.*, 2014).

Chang & Shin (2010) sugerem que o procedimento mais recomendado na prática clínica passa pela aplicação de clorhexidina a 2% posteriormente ao condicionamento ácido e previamente à aplicação do adesivo.

Nos grupos de estudo com aplicação de CHX a 2% utilizou-se o protocolo seguido por diversos autores, fazendo a sua aplicação ativamente durante 60 segundos depois do condicionamento ácido do substrato e previamente ao adesivo (Bueno, Basting, Turssi, França, & Amaral, 2015; Carrilho *et al.*, 2007; Komori *et al.*, 2009; Ricci, Sanabe, de Souza Costa, Pashley, & Hebling, 2010; Sartori, Stolf, Silva, Lopes, & Carrilho, 2013; Stanislawczuk *et al.*, 2009).

A aplicação foi realizada sem lavagem posterior com água, dado que Stanislawczuk *et al.* (2011) reportaram que este passo pode reduzir a eficácia da clorhexidina enquanto inibidor de MMPs.

Após o procedimento restaurador e de termociclagem nos grupos correspondentes, optou-se pela utilização de saliva artificial como meio de armazenamento das amostras em estufa de incubação a 37°C por 24h. Embora o meio mais utilizado seja a água destilada, a saliva artificial simula de melhor forma o meio verificado quimicamente nas condições intraorais (El Mallakh & Sarkar, 1990). A composição utilizada baseia-se na descrição feita por Fusayama, Katayori e Nomoto (1963). Deste modo utilizou-se o meio de armazenamento sugerido e utilizado em estudos adesivos por variados outros autores (Breschi *et al.*, 2009, 2010; Carrilho *et al.*, 2007, 2009; Komori *et al.*, 2009; Manfro *et al.*, 2010; Marchesi *et al.*, 2014; Mazzoni *et al.*, 2011; Pashley *et al.*, 2004).

Para as amostras correspondentes aos grupos sujeitos a envelhecimento indireto por termociclagem, seguiu-se o protocolo de Chang & Shin (2010) e Chen *et al.* (2015), definindo-se 10.000 ciclos em banhos de 30 segundos de 5-55°C como representação simulada de um ano em cavidade oral (Daneshkazemi *et al.*, 2013; Gale & Darvell, 1999).

O envelhecimento por termociclagem permite um incremento da velocidade dos processos de hidrólise das fibras de colagénio desprotegidas, motivados pelas elevadas temperaturas e pela remoção dos monómeros não devidamente polimerizados. O elevado rácio de expansão térmica dos materiais restauradores quando comparados com os substratos dentários, bem como a constante repetição de ciclos de expansão/contração dos mesmos, proporciona a formação de forças de *stress* semelhantes às condições *in vivo* e conduz à formação de falhas na interface entre a

restauração e o dente. Alterações no tamanho destas falhas podem resultar no movimento de fluídos e criar zonas de nanoinfiltração nas margens mais vulneráveis da área adesiva (Amaral *et al.*, 2007; Daneshkazemi *et al.*, 2013).

Após os métodos de armazenamento e envelhecimento mediante os grupos testados, as amostras foram seccionadas em forma de “palitos” e sujeitas a teste de resistência adesiva através de teste de microtração em máquina de testes universal (Shimadzu AG-50kNI SD MS, Shimadzu Corporation, Kyoto; Japan) a uma velocidade de 0,5 mm/min (Dalli *et al.*, 2010; De Castro *et al.*, 2003; Felizardo *et al.*, 2011; Luque-Martinez *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2013; Perdigão *et al.*, 2013; Stanislawczuk *et al.*, 2011).

Outros autores optaram por utilizar o teste a uma velocidade de 1,0mm/min (Almahdy *et al.*, 2012; Asaka *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015; Hanabusa *et al.*, 2012; Marchesi *et al.*, 2014). Todavia Reis, Bauer & Loguercio (2001) concluíram que não se verificavam diferenças nos valores de adesão à dentina quando se aplicavam diferentes velocidades no teste de microtração.

Apesar de ser um teste com as suas limitações e múltiplas variáveis associadas ao procedimento de preparação de amostras e no teste propriamente dito, considera-se atualmente este teste como a melhor opção na avaliação da força adesiva. Diversas vantagens estão associadas aos testes de microtração, seja pelo melhor aproveitamento das amostras dentárias pelo facto de um dente originar múltiplas micro-amostras sob a forma de “palitos”, seja por proporcionar igualmente um controlo mais eficaz da região a ser testada ou uma melhor distribuição do *stress* das cargas aplicadas na interface, sendo que a menor área de superfície facilita a observação microscópica e identificação do tipo de falha adesiva (Armstrong *et al.*, 2010; Sirisha *et al.*, 2014b).

Contudo, como dito anteriormente tem as suas limitações e desvantagens, sendo disso representativa a dificuldade de obtenção de amostras geometricamente consistentes, a potencial desidratação e fratura destas, bem como as exigências técnicas associadas à sensibilidade do manuseio e as variadas variáveis implícitas nas amostras como as propriedades individuais de cada substrato e a sua preparação, o que deste modo pode acabar por influenciar e contribuir para variações nos resultados obtidos (Armstrong *et al.*, 2010; Scherrer, Cesar & Swain, 2010; Sirisha *et al.*, 2014b).

Quanto aos resultados obtidos neste estudo, e começando pelos controlos que correspondem, não só mas também, ao objetivo de avaliação *in vitro* da resistência adesiva de um novo sistema adesivo universal, neste caso do adesivo All-bond Universal[®] (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) podemos rejeitar a primeira hipótese nula: Não há diferenças nos valores de resistência adesiva à dentina do sistema adesivo universal independentemente da estratégia utilizada.

No estudo de Muñoz *et al.* (2013), constatou-se que os resultados entre ambas as estratégias de aplicação do adesivo All-bond Universal, apresentam discrepâncias claramente significativas com prejuízo nos resultados apresentados no grupo *self-etch*. Sob as mesmas condições utilizadas no presente estudo e considerando os grupos testados a 24h (ABU-ER1 e ABU-SE1), o adesivo na vertente *self-etch* apresentou uma performance de resultados de força adesiva consideravelmente mais baixos.

Algumas sugestões podem ser explicar tais resultados, segundo Perdigão (2007) os adesivos *self-etch all-in-one* apresentam pior desempenho quando comparados com o mesmo protocolo em dois passos, pelo facto de apresentarem monómeros acídicos com um carácter mais hidrofílico e pela elevada concentração de água requerida para a ionização dos mesmos. Outro fator a ter em consideração pode passar pela *smear layer* incorporada na camada híbrida, dado que constitui uma barreira física à adesão, tornando o processo adesivo mais complexo no sentido de que a difusão dos monómeros adesivos e formação da camada híbrida é igualmente mais difícil de obter (Muñoz *et al.*, 2013).

Por norma, os adesivos simplificados na vertente *self-etch*, formam uma fina camada adesiva, que se torna mais susceptível à inibição de polimerização por moléculas de oxigénio (Nunes, Ceballos, Osorio & Toledano, 2005). As características do adesivo utilizado classificado como ultra-suave (pH>2.5), resultam numa desmineralização parcial da dentina, o que significa segundo Chen *et al.* (2015) a formação de uma fina camada híbrida de 0.2µm de espessura.

Wagner *et al.* (2014) testando diversos adesivos universais em ambas as vertentes, concluíram que os valores adesivos observados eram semelhantes independentemente da estratégia, tendo até o protocolo *self-etch* apresentado os resultados mais elevados após armazenamento de 24h no adesivo utilizado no presente estudo quando comparado com os restantes sistemas adesivos testados e inclusive melhor performance no imediato

que a aplicação pela técnica *etch-and-rinse*. Ao mesmo tempo, alguns aspetos associados ao protocolo podem explicar tais conclusões. O número de ciclos de termociclagem do estudo de Wagner *et al.* foi inferior ao aplicado neste estudo, 5000 e 10.000 respectivamente. O modo de armazenamento foi igualmente diferente, tendo sido realizado em água destilada, o que pode ter contribuído para as diferenças encontradas.

Pese o facto de apresentarem maior vulnerabilidade à degradação, vários autores confirmam os superiores resultados em termos de forças adesivas obtidos pelo adesivo testado no presente estudo na estratégia *etch-and-rinse* em comparação com a abordagem *self-etch*, o que vai de encontro aos resultados obtidos (Luque-Martinez *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2013; Rosa, Piva & Silva, 2015).

Como acima referido a *smear layer* constitui uma barreira física, o que dificulta a formação da camada híbrida na dentina. No protocolo *etch-and-rinse*, é realizado o condicionamento ácido prévio, sendo removida a *smear layer* e desmineralizada a camada superficial de dentina, o que aumenta a impregnação dos monómeros adesivos e a qualidade da camada híbrida estabelecida sem comprometer a susceptibilidade à nanoinfiltração (Muñoz *et al.*, 2013).

Um estudo de Mazzoni *et al.* (2013) demonstra a evidência direta do aumento de atividade da MMP-2 e MMP-9 após aplicação do adesivo, independentemente do seu uso por *etch-and-rinse* ou *self-etch*. No entanto, referem que ocorre um nível mais alto desta atividade nos sistemas adesivos *etch-and-rinse*, estando correlacionada com a mais rápida degradação da camada híbrida. O condicionamento ácido prévio da dentina pode estar igualmente relacionado com este fenómeno, pelo facto de expor maior matriz deste substrato quando comparado com o protocolo por *self-etch*.

Tendo em conta esta evidência e analisando os resultados dos grupos após termociclagem, os resultados no teste de microtração obtidos no grupo ABU-ER2 demonstraram uma clara degradação face ao grupo controlo (ABU-ER1). Algo que é concluído igualmente por Donmez *et al.* (2015) utilizando o mesmo adesivo e com menor número de ciclos (1000).

Seria hipoteticamente de esperar que no grupo ABU-SE2 também ocorressem alterações prejudiciais nos valores de resistência adesiva pela consequente degradação

hidrolítica, seja pelas diferenças de temperaturas verificadas no processo de envelhecimento que aceleram os processos de hidrólise na camada híbrida ou pela insuficiente impregnação da rede de fibras de colagénio pelos monómeros resinosos. Todavia, o adesivo aplicado como *self-etch* não apresentou diferenças significativas, apresentando maior estabilidade quando comparado com os grupos testados pela técnica *etch-and-rinse*. Marchesi *et al.* (2014) reportaram esse mesmo facto após 1 ano de armazenamento em saliva artificial. Também Hanabusa *et al.* (2012) referem a maior estabilidade dos adesivos universais na vertente *self-etch* à dentina ao longo do tempo, indo igualmente de acordo com o presente estudo.

De salientar igualmente a comparação com o estudo de Chen *et al.* (2015) onde não encontraram diferenças significativas nos resultados de força adesiva, antes e após termociclagem nos grupos testados sob a estratégia *self-etch* com o mesmo adesivo utilizado. Estes resultados podem hipoteticamente ser explicados pela presença de água nos túbulos dentinários, na qual os monómeros adesivos incompletamente polimerizados, ao manterem a sua acidez continuam a condicionar a dentina (Carvalho *et al.*, 2005; Wang & Spencer, 2005) .

Todavia, Luque-Martinez *et al.* (2014) referem que a presença residual de água ou solvente pode comprometer a performance adesiva dos sistemas universais, com principal foco na estratégia *self-etch*, onde um aumento no tempo de evaporação do solvente de 10 para 25 segundos se traduziu numa clara melhoria.

Munck, Nagakane & Suzuki (2005) e Wagner *et al.* (2014) estabeleceram também a presença da molécula 10-MDP como fator de relevo. A sua capacidade de interação química com a hidroxiapatite e as suas propriedades hidrofóbicas podem ser importantes na prevenção da degradação hidrolítica da camada híbrida após termociclagem *in vitro* e ao longo do tempo *in vivo* (Donmez *et al.*, 2015; Proença *et al.*, 2007; Van Meerbeek *et al.*, 2011; Yoshihara *et al.*, 2010).

Quanto ao tipo de fraturas obtidas no teste de microtração verifica-se que foram predominante do tipo adesivo em todos os grupos testados, tal como nos estudos de Ricci *et al.* (2010) e Stanislawczuk *et al.* (2011), todavia estes estudos foram realizados sob diferentes variáveis, seja o adesivo ou período e meio de armazenamento utilizado. No estudo de Perdigão *et al.* (2013) os resultados são semelhantes no imediato, não podendo ser extrapolados no longo prazo, dado que englobou apenas testes efetuados a 24h e sem aplicação de CHX.

O segundo e principal objetivo a que o estudo se propôs foi estabelecer uma relação entre o processo de adesão e a influência da aplicação de clorhexidina no protocolo. Desse modo, os resultados desta investigação comprovaram de facto as vantagens da introdução de digluconato de clorhexidina a 2% no protocolo adesivo à dentina.

Independentemente da estratégia ou adesivo aplicado, ocorrem fenómenos hidrolíticos ao nível da interface adesiva (Perdigão *et al.*, 2013).

A acidez resultante do processo adesivo, ativa pró-formas anteriormente inativas em formas ativas de MMPs, seja em dentina mineralizada ou desmineralizada. Acontecimento esse que pode ser explicado pela presença da molécula 10-MDP e/ou pela etapa de aplicação de ácido fosfórico na vertente *etch-and-rinse* (Marchesi *et al.*, 2014; Mazzoni *et al.*, 2013; Perdigão *et al.*, 2013).

Hashimoto, Fujita, Nagano & Ohno (2010) concluíram que num período de tempo de 100 dias ou 6 meses de envelhecimento, ocorre um decréscimo de forças adesivas. Segundo Manso, Bedran-Russo, Suh, Pashley & Carvalho (2009) pode estar relacionado com o processo de degradação hidrolítica da matriz de colagénio verificado na camada híbrida, o que comprova a afirmação de Tjäderhane *et al.* (2013), dizendo que a preservação da integridade desta é essencial à durabilidade e estabilidade da adesão à dentina.

Pashley *et al.* (2004) propôs o uso da aplicação de CHX na dentina desmineralizada previamente ao adesivo *etch-and-rinse*, visando a prevenção da degradação das fibras de colagénio na camada híbrida.

Segundo Montagner *et al.* (2014), a aplicação de CHX a 2% não afeta negativamente os valores de adesão no imediato, e ambas as concentrações de 2% e 0.2% verificaram um aumento destes valores após envelhecimento quando comparados com os grupos controlo, independentemente da estratégia utilizada. Pelo contrário, Campos *et al.* (2009) refere que apenas a uma concentração de 2% se verificam estes achados, não havendo melhorias quando associado ao adesivo *self-etch*.

Os valores obtidos nos grupos de aplicação de clorhexidina vão portanto de encontro a estes resultados. A sua aplicação não comprometeu os valores de força adesiva no imediato e contribuiu para a preservação destes valores após envelhecimento, com principal foco no grupo ABU-ER4 onde se verificaram diferenças significativas por comparação com o grupo controlo. Analisando os resultados deste mesmo grupo, podemos concluir que a aplicação de clorhexidina foi de facto benéfica, retardando o

envelhecimento da camada híbrida quando comparado com o grupo controlo ABU-ER2, indo de encontro ao estudo de Tjäderhane *et al.* (2013) que refere que sob o protocolo *etch-and-rinse* em adesivos simplificados como o All-bond Universal, a diminuição da resistência adesiva nos controlos a 1 a 2 anos é de aproximadamente 50%, enquanto que nos grupos tratados com CHX a diminuição foi de apenas 20-25%.

Os resultados destas evidências são igualmente corroborados nos estudos de Stanislawczuk *et al.* (2009) e Stanislawczuk *et al.* (2011) a seis meses e dois anos de armazenamento em água destilada respetivamente. Quando aplicada clorhexidina a 2% em dentina condicionada, não se verificaram diferenças significativas na degradação após envelhecimento. Pelo contrário, foi observada uma acentuada diminuição dos valores, quando apenas foi feita a lavagem com água nos controlos.

O oposto também se sucede, na investigação *in vivo* conduzida por Sartori *et al.* (2013) após um *follow-up* de 36 meses, concluíram que a adição desta etapa no protocolo não se traduz numa melhoria de durabilidade adesiva. Contudo certos critérios deste estudo tornam complicada uma análise comparativa. Ao contrário dos testes acima referidos, a avaliação não foi realizada por força adesiva em microtração, mas sim segundo critérios estatísticos mais ambíguos como retenção, descoloração, integridade marginal, sensibilidade pós-operatória e incidência de cáries secundárias, o que tornam a comparação menos viável.

Embora ocorra degradação hidrolítica em ambas as estratégias segundo Perdigão *et al.* (2013), a degradação hidrolítica por enzimas endógenas parece afetar apenas os sistemas adesivos *etch-and-rinse* (De Munck *et al.*, 2009).

Este facto ajuda a corroborar os resultados obtidos neste estudo. Nos grupos testados sob a abordagem *self-etch* verificaram-se melhorias mas não estatisticamente significativas aquando da aplicação de clorhexidina após envelhecimento em comparação com o grupo controlo, o que vai de encontro aos estudos de Bueno *et al.* (2015), Araújo *et al.* (2014) e Deng *et al.* (2013), embora se verifiquem diferentes variáveis associadas nestes dois últimos. No grupo de teste de 24h com CHX 2% (ABU-SE3) ocorreu uma diminuição, mas não significativa, tal como nos estudo de Jang, Hur, Kim, Kwon & Park (2010) e Bueno *et al.* (2015) demonstrando que a sua aplicação não afeta negativamente as forças adesivas imediatas igualmente nesta estratégia.

PERSPETIVAS FUTURAS

Pelo facto de a ciência de investigação ser uma área em constantes evoluções e atualizações, em estudos futuros poderá ser importante:

- Testar sob as mesmas condições a aplicação de outros SA universais;
- Investigar potenciais novos inibidores de MMPs;
- Estudar o comportamento das MMPs nos grupos experimentais;
- Tornar mais clara a compreensão dos mecanismos de ativação das MMPs e o processo de inibição das mesmas;
- Verificar num maior período de tempo o efeito da CHX enquanto inibidor de MMPs e o seu papel na preservação da camada híbrida;
- Testar outras concentrações de CHX e verificar os seus efeitos na força adesiva no imediato e longo termo;
- Introduzir novas estratégias de aplicação de CHX, fazendo parte da composição de sistemas adesivos ou do ácido utilizado no condicionamento do substrato;
- Introduzir novos métodos de aplicação do protocolo de SA que removam ou diminuam a quantidade de água residual na camada híbrida, como o *ethanol wet-bonding*, pelo facto da presença de água ser o principal catalisador dos processo de hidrólise da rede de colagénio presente na camada híbrida;
- Incorporar na prática clínica a aplicação de CHX como parte integrante do protocolo de SA.

VI. CONCLUSÃO

Tendo por base os resultados obtidos nesta investigação e considerando todas as limitações existentes, podemos rejeitar a primeira hipótese nula: Não há diferenças nos valores de resistência adesiva à dentina do sistema adesivo universal independentemente da estratégia utilizada; e aceitar a segunda hipótese alternativa: A aplicação de clorhexidina como parte do protocolo de um sistema adesivo universal ou multi-modo influencia a resistência adesiva à dentina *in vitro*.

Podemos assim concluir que:

- O sistema adesivo utilizado apresentou resultados de força adesiva (μ TBS) mais elevados no imediato na vertente *etch-and-rinse* em comparação com a vertente *self-etch*;
- Os grupos controlo testados sob a técnica *self-etch* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos, indicando que apresentam maior estabilidade em termos da preservação da camada híbrida;
- O grupo controlo ABU-ER2 apresentou uma diminuição significativa dos valores de força adesiva após termociclagem, indicando que ocorre uma degradação acentuada da camada híbrida no longo termo quando o protocolo *etch-and-rinse* é o utilizado;
- O Grupo ABU-ER4 apresentou uma estabilidade significativa dos valores de força adesiva quando comparado com o grupo controlo (ABU-ER2), indicando que de facto a aplicação de CHX 2% ajuda a preservar e a retardar o envelhecimento da camada híbrida na vertente *etch-and-rinse*;
- A aplicação de CHX 2% não influenciou os resultados de força adesiva na vertente *self-etch* após envelhecimento;
- A aplicação de CHX 2% em ambas as vertentes não influenciou negativamente as forças adesivas no imediato.

Além das vantagens já associadas à aplicação de CHX como inibidor de MMPs na dentina, os resultados desta investigação comprovaram de facto os benefícios da introdução de digluconato de clorhexidina a 2% aplicada à dentina, não influenciando negativamente os valores adesivos no imediato e contribuindo significativamente para a preservação da integridade da camada híbrida na estratégia *etch-and-rinse*.

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Tendo em consideração a atual evidência científica da utilização de CHX como inibidor de MMPs e consequente prevenção da diminuição das forças de adesão pelo retardar do envelhecimento da camada híbrida a dois anos, podemos afirmar que é clinicamente benéfica a incorporação da CHX no protocolo adesivo.

Deste modo, a introdução de digluconato de clorhexidina a 2% no protocolo adesivo à dentina poderá ser um excelente método de aumento da estabilidade a longo termo da camada híbrida face ao potencial de degradação da interface adesiva por metaloproteinases endógenas.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alex, G. (2015). Universal Adhesives: The Next Evolution in Adhesive Dentistry? *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 14–26.
- Almahdy, a., Koller, G., Sauro, S., Bartsch, J. W., Sherriff, M., Watson, T. F., & Banerjee, a. (2012). Effects of MMP Inhibitors Incorporated within Dental Adhesives. *Journal of Dental Research*, 91(6), 605–611. <http://doi.org/10.1177/0022034512446339>
- Amaral, F. L. B., Colucci, V., Palma-Dibb, R. G., & Corona, S. a M. (2007). Assessment of in vitro methods used to promote adhesive interface degradation: A critical review. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 19(6), 340–353. <http://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2007.00134.x>
- Araújo, M., Souza, L. C., Apolonio, F. M., Barros, L. O., Reis, A., Loguercio, A. D., & Saboia, V. (2014). Two-year clinical evaluation of chlorhexidine incorporation in two-step self-etch adhesive. *Journal of Dentistry*, 3, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.07.010>
- Armstrong, S., Geraldeli, S., Maia, R., Raposo, L. H. a, Soares, C. J., & Yamagawa, J. (2010). Adhesion to tooth structure: A critical review of “micro” bond strength test methods. *Dental Materials*, 26(2), 50–62. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.155>
- Armstrong, S., Vargas, M., Chung, I., Qian, F., Pashley, D., Campbell, J., & Laffoon, J. (2004). Resin-Dentin Interfacial Ultrastructure and Microtensile Dentin Bond Strength After Five-year Water Storage, 29(6).
- Asaka, Y., Amano, S., Rikuta, A., Kurokawa, H., Miyazaki, M., Platt, J. a, & Moore, B. K. (2007). Influence of thermal cycling on dentin bond strengths of single-step self-etch adhesive systems. *Operative Dentistry*, 32(1), 73–78. <http://doi.org/10.2341/06-21>
- Bengtson, C., Bengtson, A., Bengtson, N., & Turbino, M. (2008). Efeito da Clorexidina 2% na Resistência de União de Dois Sistemas Adesivos à Dentina Humana. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria E Clínica Integrada*, 8(1), 51–56. <http://doi.org/10.4034/1519.0501.2008.0081.0010>

- Boushell, L. W., & Sturdevant, J. R. (2013). Clinical Significance of Dental Anatomy, Histology, Physiology, and Occlusion. In *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry* (pp. 1–40).
- Breschi, L., Cammelli, F., Visintini, E., Mazzoni, A., Carrilho, M., Cadenaro, M., ... Tay, F. R. (2009). Etch-and-Rinse Dentin Bonds : a 12-Month in Vitro Study, *11*(3), 191–198.
- Breschi, L., Ferracane, J. L., Cadenaro, M., Mazzoni, A., & Hilton, T. J. (2013). Adhesion to Enamel and Dentin. In *Summitt's Fundamentals of Operative Dentistry* (Fourth Edition, pp. 207–248). Quintessence.
- Breschi, L., Mazzoni, A., Nato, F., Carrilho, M., Visintini, E., Tjäderhane, L., Pashley, D. H. (2010). Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. *Dental Materials*, *26*(4), 320–325. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.153>
- Breschi, L., Mazzoni, A., Ruggeri, A., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., & De Stefano Dorigo, E. (2008). Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dental Materials*, *24*(1), 90–101. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2007.02.009>
- Bueno, M., Basting, R., Turssi, C., França, F., & Amaral, F. (2015). Effect of 2 % chlorhexidine digluconate application and water storage on the bond strength to superficial and deep dentin. *Journal of Adhesion Science and Technology*, (August). <http://doi.org/10.1080/01694243.2015.1025463>
- Campos, E. A., Correr, G. M., Leonardi, D. P., Barato-Filho, F., Gonzaga, C. C., & Zielak, J. C. (2009). Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *Journal of Dentistry*, *37*(2), 108–114. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.10.003>
- Cardoso, M. V., De Almeida Neves, a., Mine, a., Coutinho, E., Van Landuyt, K., De Munck, J., & Van Meerbeek, B. (2011). Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Australian Dental Journal*, *56*(SUPPL. 1), 31–44. <http://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01294.x>
- Carrilho, M., Geraldeli, S., Tay, F., de Goes, M. F., Carvalho, R. M., Tjäderhane, L., Pashley, D. (2007). In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine.

- Journal of Dental Research*, 86(6), 529–533.
<http://doi.org/10.1177/154405910708600608>
- Carrilho, M. R., Carvalho, R. M., Sousa, E. N., Nicolau, J., Mazzoni, A., Tjäderhane, L., ... David, H. (2011). Substantivity of Chlorhexidine to Human Dentin, 26(8), 779–785. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2010.04.002>.Substantivity
- Carrilho, M. R. O., Carvalho, R. M., de Goes, M. F., di Hipólito, V., Geraldeli, S., Tay, F. R., ... Tjaderhane, L. (2007). Chlorhexidine Preserves Dentin Bond in vitro. *Changes*, 29(6), 997–1003.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- Carrilho, M., Tay, F. R., Donnelly, A. M., Agee, K. a., Tjäderhane, L., Mazzoni, A., Pashley, D. H. (2009). Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 90(1), 373–380. <http://doi.org/10.1002/jbm.b.31295>
- Carvalho, R. M., Chersoni, S., Frankenberger, R., Pashley, D. H., Prati, C., & Tay, F. R. (2005). A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials*, 26(9), 1035–1042. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.003>
- Chang, Y.-E., & Shin, D.-H. (2010). Effect of chlorhexidine application methods on microtensile bond strength to dentin in Class I cavities. *Operative Dentistry*, 35(6), 618–623. <http://doi.org/10.2341/09-360-L>
- Chen, C., Niu, L.-N., Xie, H., Zhang, Z.-Y., Zhou, L.-Q., Jiao, K., Tay, F. R. (2015). Bonding of universal adhesives to dentine – Old wine in new bottles? *Journal of Dentistry*, 43(5), 525–536. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.03.004>
- Chimeli, T. B. C., D’Alpino, P. H. P., Pereira, P. N., Hilgert, L. A., Di Hipólito, V., & Garcia, F. C. P. (2014). Effects of solvent evaporation on water sorption / solubility and nanoleakage of adhesive systems, 0(4), 294–301.
- Coelho, A., Canta, J. P., Martins, J. N. R., Oliveira, S. a., & Marques, P. (2012). Perspetiva histórica e conceitos atuais dos sistemas adesivos amelodentinários - revisão da literatura. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentaria E Cirurgia Maxilofacial*, 53(1), 39–46. <http://doi.org/10.1016/j.rpemd.2011.11.008>
- Dalli, M., Ercan, E., Zorba, Y. O., Ince, B., Şahbaz, C., Bahşi, E., & Çolak, H. (2010).

- Effect of 1% chlorhexidine gel on the bonding strength to dentin. *Journal of Dental Sciences*, 5(1), 8–13. [http://doi.org/10.1016/S1991-7902\(10\)60002-5](http://doi.org/10.1016/S1991-7902(10)60002-5)
- Daneshkazemi, A. R., Davari, A. R., Ataei, E., Dastjerdi, F., & Hajighasemi, E. (2013). Effects of mechanical and thermal load cycling on micro tensile bond strength of clearfil SE bond to superficial dentin, *10*(2), 202–209.
- Dantas, D. C. R. E., Ribeiro, A. I. A. M., Lima, L. H. M. D. A., de Lima, M. G., Guênes, G. M. T., Braz, A. K. S., & Braz, R. (2008). Influence of water storage time on the bond strength of etch-and-rinse and self-etching adhesive systems. *Brazilian Dental Journal*, 19(3), 219–223. <http://doi.org/10.1590/S0103-64402008000300008>
- De Castro, F. L. A., de Andrade, M. F., Duarte Júnior, S. L. L., Vaz, L. G., & Ahid, F. J. M. (2003). Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 5(2), 129–138.
- De Munck, J., Van den Steen, P. E., Mine, A., Van Landuyt, K. L., Poitevin, A., Opdenakker, G., & Van Meerbeek, B. (2009). Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *Journal of Dental Research*, 88(12), 1101–1106. <http://doi.org/10.1177/0022034509346952>
- De Munck, J., Van Landuyt, K., Peumans, M., Poitevin, A., Lambrechts, P., Braem, M., & Meerbeek, B. Van. (2005). Critical Review of the Durability of Adhesion to Tooth Tissue : Methods and Results, 118–132. <http://doi.org/10.1177/154405910508400204>
- Deng, D., Huang, X., Huang, C., Yang, T., Du, X., Wang, Y., Pei, D. (2013). Effects of chlorhexidine on bonding durability of different adhesive systems using a novel thermocycling method. *Australian Dental Journal*, 58(2), 148–55. <http://doi.org/10.1111/adj.12038>
- Donmez, N., Siso, S. H., Usumez, A., & Bayrakc, I. (2015). Effect of thermal cycling on micro- tensile bond strength of composite restorations bonded with multimode adhesive. *Journal of Adhesion Science and Technology*, (August). <http://doi.org/10.1080/01694243.2014.1003180>
- Duarte, S., Perdigão, J., & Lopes, M. M. (2006). Effect of dentin conditioning time on nanoleakage. *Operative Dentistry*, 31(4), 500–511. <http://doi.org/10.2341/05-86>

- Eckert, G. J., & Platt, J. a. (2007). A statistical evaluation of microtensile bond strength methodology for dental adhesives. *Dental Materials*, 23(3), 385–391. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2006.02.007>
- Felizardo, K. R., Lemos, L. V. F. M., de Carvalho, R. V., Gonini Junior, A., Lopes, M. B., & Moura, S. K. (2011). Bond strength of HEMA-containing versus HEMA-free self-etch adhesive systems to dentin. *Brazilian Dental Journal*, 22(6), 468–472. <http://doi.org/10.1590/S0103-64402011000600005>
- Ferreira, J. C., Pires, P. T., Oliveira, S. a., Silva, M. J., & Melo, P. R. (2012). Influence of Different Solvents on the Morphology of the Hybrid Layer Using Two-Step Etch-and-Rinse Adhesives. *The Journal of Adhesion*, 88(9), 787–801. <http://doi.org/10.1080/00218464.2012.694300>
- Franco, A. P., Santos, F., Martins, G. C., Pilatti, G., Gomes, O., & Gomes, J. (2007). Desinfecção De Cavidades Com Clorexidina. *Health San Francisco*, 13, 53–58.
- Fusayama, T., Katayori, T., & Nomoto, S. (1963). Corrosion of Gold and Amalgam Placed in Contact with Each other. *Journal of Dental Research*, 42(5), 1183–1197. <http://doi.org/10.1177/00220345630420051301>
- Gale, M. S., & Darvell, B. W. (1999). Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *Journal of Dentistry*, 27(2), 89–99. [http://doi.org/10.1016/S0300-5712\(98\)00037-2](http://doi.org/10.1016/S0300-5712(98)00037-2)
- Gross, J., & Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: a Tissue Culture Assay*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(6), 1014–1022. <http://doi.org/10.1073/pnas.48.6.1014>
- Hamouda, I. M., Samra, N. R., & Badawi, M. F. (2011). Microtensile bond strength of etch and rinse versus self-etch adhesive systems. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(3), 461–466. <http://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2010.12.007>
- Hanabusa, M., Mine, A., Kuboki, T., Momoi, Y., Van Ende, A., Van Meerbeek, B., & De Munck, J. (2012). Bonding effectiveness of a new “multi-mode” adhesive to enamel and dentine. *Journal of Dentistry*, 40(6), 475–484. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.02.012>
- Hashimoto, M., Fujita, S., Nagano, F., & Ohno, H. (2010). Ten-years degradation of

- resin – dentin bonds. *European Journal of Oral Sciences*, 404–410.
- Hebling, J., Pashley, D. H., Tjäderhane, L., & Tay, F. R. (2005). Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *Practitioner*, 249(1675), 741–746. <http://doi.org/10.1177/154405910508400811>
- Jang, S.-H., Hur, B., Kim, H.-C., Kwon, Y.-H., & Park, J.-K. (2010). Effect of 2% chlorhexidine application on microtensile bond strength of resin composite to dentin using one-step self-etch adhesives. *Journal of Korean Academy of Conservative Dentistry*, 35(6), 486. <http://doi.org/10.5395/JKACD.2010.35.6.486>
- Komori, P. C. P., Pashley, D. H., Tjäderhane, L., Breschi, L., Mazzoni, A., de Goes, M. F., ... Carrilho, M. R. (2009). Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Operative Dentistry*, 34(2), 157–65. <http://doi.org/10.2341/08-55>
- Liu, Y., Tjäderhane, L., Breschi, L., Mazzoni, a, Li, N., Mao, J., Tay, F. R. (2011). Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *Journal of Dental Research*, 90(8), 953–968. <http://doi.org/10.1177/0022034510391799>
- Luque-Martinez, I. V., Perdigão, J., Muñoz, M. a., Sezinando, A., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2014). Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dental Materials*, 0, 1126–1135. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2014.07.002>
- Mallakh (El), B. F., & Sarkar, N. K. (1990). Fluoride release from glass-ionomer cements in de-ionized water and artificial saliva. *Dental Materials*, 6(2), 118–122. [http://doi.org/10.1016/S0109-5641\(05\)80041-7](http://doi.org/10.1016/S0109-5641(05)80041-7)
- Manfro, A. R. G., Reis, A., Loguercio, A., Imparato, J. C. P., & Raggio, D. P. (2010). Effect of chlorhexidine concentration on the bond strength to dentin in primary teeth, 25(1), 88–91.
- Manso, A. P., Bedran-Russo, A. K., Suh, B., Pashley, D. H., & Carvalho, R. M. (2009). Mechanical stability of adhesives under water storage. *Dental Materials*, 25(6), 744–749. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2008.12.006>
- Marchesi, G., Frassetto, A., Mazzoni, A., Apolonio, F., Diolosà, M., Cadenaro, M., Breschi, L. (2014). Adhesive performance of a multi-mode adhesive system: 1-

- Year in vitro study. *Journal of Dentistry*, 42(5), 603–612. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.008>
- Marshall, G. W., Marshall, S. J., Kinney, J. H., & Balooch, M. (1997). The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *Journal of Dentistry*, 25(6), 441–458. [http://doi.org/10.1016/S0300-5712\(96\)00065-6](http://doi.org/10.1016/S0300-5712(96)00065-6)
- Marshall, S. J., Bayne, S. C., Baier, R., Tomsia, A. P., & Marshall, G. W. (2010). A review of adhesion science. *Dental Materials*, 26(2), 11–16. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.157>
- Mazzoni, a, Scaffa, P., Carrilho, M., Tjäderhane, L., Di Lenarda, R., Polimeni, a, Breschi, L. (2013). Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *Journal of Dental Research*, 92(1), 82–6. <http://doi.org/10.1177/0022034512467034>
- Mazzoni, A., Carrilho, M., Papa, V., Tjäderhane, L., Gobbi, P., Nucci, C., ... Breschi, L. (2011). MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: biochemical and immunohistochemical analysis. *Journal of Dentistry*, 39(7), 470–7. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.04.004>
- Milia, E., Cumbo, E., Jose A. Cardoso, R., & Gallina, G. (2012). Current Dental Adhesives Systems. A Narrative Review. *Current Pharmaceutical Design*, 18(34), 5542–5552. <http://doi.org/10.2174/138161212803307491>
- Miranda, C., Silva, G. V., Vieira, M., & Costa, S. (2014). Influence of the chlorhexidine application on adhesive interface stability : literature review, 11(3), 276–285.
- Miyazaki, M., Tsujimoto, A., Tsubota, K., Takamizawa, T., Kurokawa, H., & Platt, J. a. (2014). Important compositional characteristics in the clinical use of adhesive systems. *Journal of Oral Science*, 56(1), 1–9. <http://doi.org/10.2334/josnurd.56.1>
- Montagner, a F., Sarkis-Onofre, R., Pereira-Cenci, T., & Cenci, M. S. (2014). MMP Inhibitors on Dentin Stability: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res*, 93, 733–743. <http://doi.org/10.1177/0022034514538046>
- Moon, P. C., Weaver, J., & Brooks, C. N. (2010). Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. *The Open Dentistry Journal*, 4, 147–152. <http://doi.org/10.2174/1874210601004010147>

- Munck, J. De, Nagakane, K., & Suzuki, K. (2005). Hydrolytic Stability of Self-etch, 1160–1165.
- Muñoz, M. A., Luque, I., Hass, V., Reis, A., Loguercio, A. D., & Bombarda, N. H. C. (2013). Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *Journal of Dentistry*, 41(5), 404–411. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.03.001>
- Nakabayashi, N., Kojima, K., & Masuhara, E. (1982). The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal of Biomedical Materials Research*, 16(3), 265–273. <http://doi.org/10.1002/jbm.820160307>
- Nanci, A. (2013). *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function* (8th edition, pp. 122–204). Elsevier.
- Nunes, T. G., Ceballos, L., Osorio, R., & Toledano, M. (2005). Spatially resolved photopolymerization kinetics and oxygen inhibition in dental adhesives. *Biomaterials*, 26(14), 1809–1817. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.012>
- Pashley, D. H., Tay, F. R., Breschi, L., Tjäderhane, L., Carvalho, R. M., & Carrilho, M. (2011). State of the art etch-and-rinse adhesives, 27(1), 1–34. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016.State>
- Pashley, Tay, F. ., Yiu, C., Hashimoto, M., Breschi, L., Carvalho, R. ., & Ito, S. (2004). Collagen Degradation by Host-derived Enzymes during Aging. *Journal of Dental Research*, 216–221.
- Perdigão, J. (2007). New Developments in Dental Adhesion. *Dental Clinics of North America*, 51(2), 333–357. <http://doi.org/10.1016/j.cden.2007.01.001>
- Perdigao, J., & Loguercio, a D. (2014). Universal or Multi-mode Adhesives: Why and How? *J Adhes Dent*, 16(2), 193–194. <http://doi.org/10.3290/j.jad.a31871>
- Perdigão, J., Muñoz, M., Sezinando, a, Luque-Martinez, I., Staichak, R., Reis, a, & Loguercio, A. (2013). Immediate Adhesive Properties to Dentin and Enamel of a Universal Adhesive Associated With a Hydrophobic Resin Coat. *Operative Dentistry*, 1–11. <http://doi.org/10.2341/13-203-LR>
- Perdigão, J., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2013). Dentin adhesion and MMPs: A comprehensive review. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 25(4), 219–

241. <http://doi.org/10.1111/jerd.12016>
- Perdigão, J., Swift, E. J., & Walter, R. (2013). Fundamental Concepts of Enamel and Dentin Adhesion. In *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry* (6th edition, pp. 114–140).
- Proença, J. P., Polido, M., Osorio, E., Erhardt, M. C. G., Aguilera, F. S., García-Godoy, F., ... Toledano, M. (2007). Dentin regional bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems. *Dental Materials*, 23(12), 1542–1548. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2007.02.001>
- Reis, A., Bauer, J., & Loguercio, A. D. (2001). Influence of cross-head speed on resin-dentin shear bond strength. *Dental Materials*, 17(2), 165–169. [http://doi.org/10.1016/S0109-5641\(00\)00060-9](http://doi.org/10.1016/S0109-5641(00)00060-9)
- Ricci, H. a., Sanabe, M. E., de Souza Costa, C. a., Pashley, D. H., & Hebling, J. (2010). Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *European Journal of Oral Sciences*, 118(4), 411–416. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00754.x>
- Rosa, W. L. D. O. Da, Piva, E., & Silva, A. F. Da. (2015). Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 43(7), 765–776. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.04.003>
- Sabatini, C., & Pashley, D. (2014). Mechanisms Regulating the Degradation of Dentin Matrices by Endogenous Dentin Proteases and their Role in Dental Adhesion. A Review, 27(4), 203–214.
- Sartori, N., Stolf, S. C., Silva, S. B., Lopes, G. C., & Carrilho, M. (2013). Influence of chlorhexidine digluconate on the clinical performance of adhesive restorations: A 3-year follow-up. *Journal of Dentistry*, 41(12), 1188–1195. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.09.004>
- Scherrer, S. S., Cesar, P. F., & Swain, M. V. (2010). Direct comparison of the bond strength results of the different test methods: A critical literature review. *Dental Materials*, 26(2), e78–e93. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2009.12.002>
- Sezinando, A. (2014). Looking for the ideal adhesive – A review. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária E Cirurgia Maxilofacial*, 55(4), 194–206. <http://doi.org/10.1016/j.rpemd.2014.07.004>

- Silva e Souza, M. H., Carneiro, K. G. K., Lobato, M. F., Silva e Souza, P. D. A. R., & de Góes, M. F. (2010). Adhesive systems: important aspects related to their composition and clinical use. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 18(3), 207–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856995>
- Singh, H., Dhillon, J., Kapoor, P., & Kaur, M. (2014). Evaluation of three different concentrations of Chlorhexidine for their substantivity to human dentin. *Indian Journal of Dentistry*, 5(4), 199. <http://doi.org/10.4103/0975-962X.144726>
- Sirisha, K., Rambabu, T., Shankar, Y. R., & Ravikumar, P. (2014a). Validity of bond strength tests : A critical review : Part I. <http://doi.org/10.4103/0972-0707.136340>
- Sirisha, K., Rambabu, T., Shankar, Y. R., & Ravikumar, P. (2014b). Validity of bond strength tests : A critical review- Part II. <http://doi.org/10.4103/0972-0707.139823>
- Stanislawczuk, R., Amaral, R. C., Zander-Grande, C., Gagler, D., Reis, a., & Loguercio, a D. (2009). Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. *Operative Dentistry*, 34(4), 481–490. <http://doi.org/10.2341/08-016-L>
- Stanislawczuk, R., Pereira, F., Muñoz, M. A., Luque, I., Farago, P. V., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2014). Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin-dentine interfaces. *Journal of Dentistry*, 42(1), 39–47. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.002>
- Stanislawczuk, R., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2011). A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *Journal of Dentistry*, 39(1), 40–47. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.10.001>
- Strobel, S., & Hellwig, E. (2014). The effects of matrix-metallo- proteinases and chlorhexidine on the adhesive bond. *Swiss Dental Journal*.
- Tjäderhane, L., Nascimento, F., Breschi, L., Mazzoni, A., Tersariol, T., Geraldeli, S., Pashley, D. (2014). Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins, 23(4), 333–336. <http://doi.org/10.1097/WAD.0b013e3181aba588.MRI>
- Tjäderhane, L., Nascimento, F. D., Breschi, L., Mazzoni, A., Tersariol, I. L. S., Geraldeli, S., Pashley, D. H. (2013). Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - A review. *Dental Materials*, 29(10), 999–1011.

- <http://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.016>
- Van Landuyt, K. L., De Munck, J., Snauwaert, J., Coutinho, E., Poitevin, A., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B. (2005). Monomer-Solvent Phase Separation in One-step, 183–188.
- Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Vanherle, G. (2003). Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Operative Dentistry-University of Washington*-, 28(3), 215–235.
- Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, a., De Munck, J., & Van Landuyt, K. L. (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials*, 27(1), 17–28. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.023>
- Wagner, A., Wendler, M., Petschelt, A., Belli, R., & Lohbauer, U. (2014). Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. *Journal of Dentistry*, 42(7), 800–807. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.04.012>
- Wang, Y., & Spencer, P. (2005). Continuing etching of an all-in-one adhesive in wet dentin tubules. *Journal of Dental Research*, 84(4), 350–354. <http://doi.org/10.1177/154405910508400411>
- Yoshida, Y., & Inoue, S. (2012). Chemical analyses in dental adhesive technology. *Japanese Dental Science Review*, 48(2), 141–152. <http://doi.org/10.1016/j.jdsr.2012.03.001>
- Yoshihara, K., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Fukegawa, D., Hayakawa, S., Mine, A., Van Meerbeek, B. (2010). Nano-controlled molecular interaction at adhesive interfaces for hard tissue reconstruction. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3573–3582. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.024>
- Zhang, S., & Kern, M. (2009). The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *International Journal of Oral Science*, 1(4), 163–176. <http://doi.org/10.4248/IJOS.09044>

VIII. ANEXOS

Anexo 1 : Aprovação da Comissão de Ética do ISCSEM

41



Ex.mo Senhor

Ricardo Jorge Lopes Gois

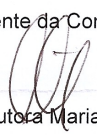
Monte de Caparica, 29 de janeiro de 2015

Ex.mo Senhor,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado *"Efeito da variação do protocolo de um sistema adesivo – Influência da Clorohexidina"*, foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz


Profª. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

c.c. – Prof. Doutor Pedro Melo Moura

Anexo 2 : Análise Estatística

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Mpa
Tamhane

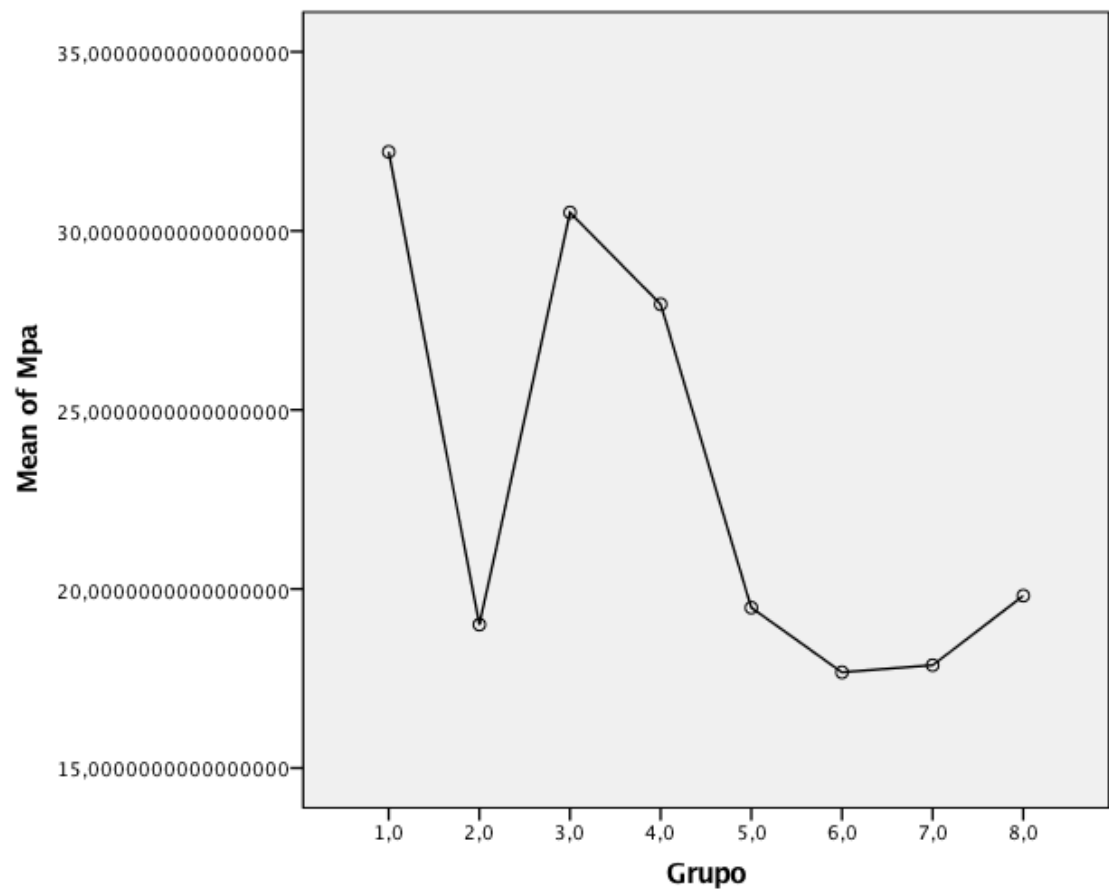
(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,0	2,0	13,202341 121309821 *	2,2849813 14950431	,000	5,8834079 82688806	20,521274 259930838
	3,0	1,6957083 19616003	2,4171818 90420585	1,000	- 6,0253347 63746628	9,4167514 02978633
	4,0	4,2578454 66801047	2,3486361 37451042	,879	- 3,2450221 02046497	11,760713 035648592
	5,0	12,731023 309418358 *	2,3166974 54998690	,000	5,3072243 42504330	20,154822 276332386
	6,0	14,534795 577187122 *	2,5779678 81684564	,000	6,2842867 71873063	22,785304 382501180
	7,0	14,337278 442079153 *	2,2211277 29605112	,000	7,2143401 15697795	21,460216 768460512
	8,0	12,397079 674362995 *	2,2993006 35208923	,000	5,0385137 19318620	19,755645 629407372
2,0	1,0	- 13,202341 121309821 *	2,2849813 14950431	,000	- 20,521274 259930838	- 5,8834079 82688806
	3,0	- 11,506632 801693819 *	1,8914080 65986759	,000	- 17,542060 313651145	- 5,4712052 89736493

	4,0	- 8,9444956 54508774*	1,8029830 52289591	,000	- 14,678251 439480832	- 3,2107398 69536717
	5,0	- ,47131781 1891463	1,7611766 74470778	1,000	- 6,1117937 14859255	5,1691580 91076328
	6,0	1,3324544 55877301	2,0929822 21544115	1,000	- 5,4100696 54634635	8,0749785 66389236
	7,0	1,1349373 20769332	1,6334211 25100108	1,000	- 4,0683685 17346555	6,3382431 58885219
	8,0	- ,80526144 6946826	1,7382288 66339154	1,000	- 6,3440018 47681107	4,7334789 53787455
3,0	1,0	- 1,6957083 19616003	2,4171818 90420585	1,000	- 9,4167514 02978633	6,0253347 63746628
	2,0	11,506632 801693819*	1,8914080 65986759	,000	5,4712052 89736493	17,542060 313651145
	4,0	2,5621371 47185045	1,9678355 03427083	,998	- 3,6981336 67726697	8,8224079 62096786
	5,0	11,035314 989802355*	1,9296040 94213261	,000	4,8646748 92347810	17,205955 087256900
	6,0	12,839087 257571120*	2,2365605 87465578	,000	5,6624891 23003527	20,015685 392138710
	7,0	12,641570 122463150*	1,8137511 55376044	,000	6,8563610 48210777	18,426779 196715522
	8,0	10,701371 354746993*	1,9086823 39594342	,000	4,6180876 35645296	16,784655 073848690
4,0	1,0	- 4,2578454 66801047	2,3486361 37451042	,879	- 11,760713 035648592	3,2450221 02046497
	2,0	8,9444956 54508774*	1,8029830 52289591	,000	3,2107398 69536717	14,678251 439480832

	3,0	- 2,5621371 47185045	1,9678355 03427083	,998	- 8,8224079 62096786	3,6981336 67726697
	5,0	8,4731778 42617310*	1,8430125 81391754	,000	2,5940726 60584460	14,352283 024650163
	6,0	10,276950 110386075*	2,1622966 20764156	,000	3,3374369 11147473	17,216463 309624675
	7,0	10,079432 975278106*	1,7213415 31594369	,000	4,6146761 61183289	15,544189 789372922
	8,0	8,1392342 07561948*	1,8210962 87471656	,000	2,3548836 00234194	13,923584 814889702
5,0	1,0	- 12,731023 309418358*	2,3166974 54998690	,000	- 20,154822 276332386	- 5,3072243 42504330
	2,0	,47131781 1891463	1,7611766 74470778	1,000	- 5,1691580 91076328	6,1117937 14859255
	3,0	- 11,035314 989802355*	1,9296040 94213261	,000	- 17,205955 087256900	- 4,8646748 92347810
	4,0	- 8,4731778 42617310*	1,8430125 81391754	,000	- 14,352283 024650163	- 2,5940726 60584460
	6,0	1,8037722 67768764	2,1275624 71003976	1,000	- 5,0542111 11662643	8,6617556 47200170
	7,0	1,6062551 32660795	1,6775017 31816724	1,000	- 3,7629538 89946870	6,9754641 55268461
	8,0	- ,33394363 5055363	1,7797154 49193917	1,000	- 6,0247662 08771491	5,3568789 38660766
6,0	1,0	- 14,534795 577187122*	2,5779678 81684564	,000	- 22,785304 382501180	- 6,2842867 71873063

	2,0	- 1,3324544 55877301	2,0929822 21544115	1,000	- 8,0749785 66389236	5,4100696 54634635
	3,0	- 12,839087 257571120 *	2,2365605 87465578	,000	- 20,015685 392138710	- 5,6624891 23003527
	4,0	- 10,276950 110386075 *	2,1622966 20764156	,000	- 17,216463 309624675	- 3,3374369 11147473
	5,0	- 1,8037722 67768764	2,1275624 71003976	1,000	- 8,6617556 47200170	5,0542111 11662643
	7,0	- ,19751713 5107969	2,0230776 95306807	1,000	- 6,7264754 27238096	6,3314411 57022159
	8,0	- 2,1377159 02824127	2,1086057 90824662	1,000	- 8,9223193 03988942	4,6468874 98340689
7,0	1,0	- 14,337278 442079153 *	2,2211277 29605112	,000	- 21,460216 768460512	- 7,2143401 15697795
	2,0	- 1,1349373 20769332	1,6334211 25100108	1,000	- 6,3382431 58885219	4,0683685 17346555
	3,0	- 12,641570 122463150 *	1,8137511 55376044	,000	- 18,426779 196715522	- 6,8563610 48210777
	4,0	- 10,079432 975278106 *	1,7213415 31594369	,000	- 15,544189 789372922	- 4,6146761 61183289
	5,0	- 1,6062551 32660795	1,6775017 31816724	1,000	- 6,9754641 55268461	3,7629538 89946870
	6,0	- ,19751713 5107969	2,0230776 95306807	1,000	- 6,3314411 57022159	6,7264754 27238096

8,0	-	1,9401987 67716158	1,6533929 88167925	1,000	- 7,1984140 05727345	3,3180164 70295029
8,0	1,0	- 12,397079 674362995 *	2,2993006 35208923	,000	- 19,755645 629407372	- 5,0385137 19318620
	2,0	,80526144 6946826	1,7382288 66339154	1,000	- 4,7334789 53787455	6,3440018 47681107
	3,0	- 10,701371 354746993 *	1,9086823 39594342	,000	- 16,784655 073848690	- 4,6180876 35645296
	4,0	- 8,1392342 07561948*	1,8210962 87471656	,000	- 13,923584 814889702	- 2,3548836 00234194
	5,0	,33394363 5055363	1,7797154 49193917	1,000	- 5,3568789 38660766	6,0247662 08771491
	6,0	2,1377159 02824127	2,1086057 90824662	1,000	- 4,6468874 98340689	8,9223193 03988942
	7,0	1,9401987 67716158	1,6533929 88167925	1,000	- 3,3180164 70295029	7,1984140 05727345



(O presente trabalho encontra-se ao abrigo do atual acordo ortográfico)