



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO



JOYCE FIGUEIRA DE ARAÚJO GATTI

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA ASSOCIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE APLICAÇÃO
PRÉVIA DA CLOREXIDINA E SATURAÇÃO DA DENTINA POR ETANOL
NA ESTABILIDADE DA UNIÃO RESINA-DENTINA**



SÃO LUÍS

2017

JOYCE FIGUEIRA DE ARAÚJO GATTI

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA ASSOCIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE APLICAÇÃO
PRÉVIA DA CLOREXIDINA E SATURAÇÃO DA DENTINA POR ETANOL
NA ESTABILIDADE DA UNIÃO RESINA-DENTINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Darlon Martins Lima.

SÃO LUÍS

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Gatti, Joyce Figueira de Araújo.

Avaliação in vitro da associação das técnicas de aplicação prévia da clorexidina e saturação da dentina por etanol na estabilidade da união resina-dentina / Joyce Figueira de Araújo Gatti. - 2017.

76 f.

Orientador(a): Darlon Martins Lima.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Odontologia/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2017.

1. Adesivos dentinários. 2. Clorexidina. 3. Etanol.
I. Lima, Darlon Martins. II. Título. |

JOYCE FIGUEIRA DE ARAÚJO GATTI

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA ASSOCIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE APLICAÇÃO
PRÉVIA DA CLOREXIDINA E SATURAÇÃO DA DENTINA POR ETANOL
NA ESTABILIDADE DA UNIÃO RESINA-DENTINA**

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Doutorado em Odontologia, em sessão pública realizada no dia / / , considerou a candidata:

() APROVADA

() REPROVADA

1) Examinador: _____
Prof. Dr. Adriano Augusto Melo de Mendonça

2) Examinador: _____
Prof^a. Dr^a. Karina Gama Kato Carneiro

3) Examinador: _____
Prof^a. Dr^a. Daniele Meira Conde Marques

4) Examinador: _____
Prof^a. Dr^a. Leily Macedo Firoozmand

5) Presidente (Orientador): _____
Prof. Dr. Darlon Martins Lima

”Conhecimento não é aquilo
que você sabe, mas o que
você faz com aquilo que você
sabe.” – Aldous Huxley

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por sempre ser minha força, meu amparo e meu equilíbrio para cumprir meu objetivo até o final sem desistir e hoje estar vencendo mais uma etapa importante em minha vida.

Aos meus pais, Joaquim e Virginia Araújo, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins, acreditando na minha capacidade e me incentivando sempre a dar o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu querido esposo André Gatti, por me apoiar em todas as situações, ser meu colo, meu porto seguro, meu braço direito e esquerdo, ter paciência, amor e compreensão para que esse trabalho pudesse ser concretizado, fazendo do meu sonho o nosso sonho!

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Darlon Martins Lima, pela confiança depositada em mim desde o início e pela oportunidade em desenvolver esse trabalho, colaborando para meu crescimento profissional, me dando o suporte necessário durante o doutorado, principalmente nos momentos em que eu precisava estar na minha cidade, permitindo assim, que essa etapa fosse bem concluída e o sonho alcançado.

Aos professores do PPGO, que estiveram sempre por perto me ajudando de alguma forma, seja na prática do trabalho ou nos corredores com um sorriso ou palavra amiga, em especial àqueles que sempre estiveram disponíveis e acessíveis durante a minha caminhada na UFMA, como o professor José Roberto Bauer, que me ajudou não só a tirar dúvidas referentes à tese, mas também a realizar outras atividades importantes para o meu crescimento como pesquisadora.

Às professoras Leily Firoozmand e Cláudia Côelho, que foram fundamentais na etapa da qualificação da tese, colaborando substancialmente com o trabalho, também pela sua paciência e compreensão nos momentos mais conturbados, permitindo que tudo ocorresse no tempo determinado.

À minha amiga Karina Kato, que foi minha maior incentivadora a seguir esse caminho na UFMA, sendo uma peça fundamental nessa minha jornada. Essa conquista tem muito de você, muito obrigada por tudo!

Aos meus colegas do PPGO, que estiveram comigo nessa jornada, ajudando a aliviar a tristeza da distância de casa, em especial às amigas que estiveram sempre comigo dentro e fora da UFMA e que levarei sempre comigo todo o carinho recebido: Ana Karla Aragão, Érica Valois e Fábria Roma.

Às minhas queridas Josi e Noêmia, que sempre me ajudaram quando precisei, e estavam sempre sorrindo e com bom humor, jamais esquecerei tudo que fizeram por mim.

Ao meu tio querido, Manoel Ernandes Araújo, que me acolheu com todo carinho, foi incansável durante esses anos, sempre estando ali disponível para me ajudar; sem seu apoio tudo seria bem mais difícil e cansativo. Obrigada pelos momentos alegres juntos!

Aos meus amigos de Belém, em especial Thaís Barros, Esther Braga, Sandro Loretto e Mário Honorato, que estiveram comigo também nessa caminhada, apoiando em todos os momentos, dando o suporte no trabalho quando eu precisava e incentivando a ir até o fim.

Aos alunos da iniciação científica, Luana e Mauro, que colaboraram na parte prática inicial da pesquisa, fazendo com que o desenvolvimento da primeira etapa do trabalho fosse mais rápido.

Por fim, à Universidade Federal do Maranhão e ao PPGO, que abriram as portas permitindo que eu pudesse fazer o doutorado em São Luís e vencer mais essa etapa profissional, para desenvolver minhas atividades com mais qualidade.

RESUMO

A busca por restaurações adesivas que tenham maior durabilidade na cavidade bucal é constante. O grande desafio da adesão é a união da resina à dentina, pois este substrato apresenta maior quantidade de água na sua composição, comprometendo o processo adesivo. Dois grandes problemas relacionados à degradação da interface adesiva resina-dentina ao longo do tempo são conhecidos: a degradação hidrolítica, ocasionada pelos efeitos deletérios da água inerente ao dente e ao material adesivo; e a degradação enzimática, ocasionada pelas enzimas proteolíticas, em especial as metaloproteases (MMP's) presentes na estrutura dentinária e ativadas após o condicionamento ácido. Várias propostas têm sido testadas para minimizar esses problemas e melhorar a estabilidade da interface resina-dentina. No presente trabalho, foi dado enfoque para duas delas: a aplicação de clorexidina a 2% (CHX) e a técnica da adesão úmida por etanol (TAUE). O objetivo principal foi avaliar *in vitro* os efeitos da associação dessas duas técnicas nos valores de resistência de união (RU) à dentina após 24h, 6 meses e 12 meses de armazenamento em água por meio de testes de microtração. Foram utilizadas duas formas de associação: a primeira aplicando as técnicas em passos separados, sendo a CHX aplicada previamente à TAUE; e a segunda por meio de uma solução experimental manipulada em laboratório farmacêutico, composta por CHX 2% diluída em solução de etanol absoluto e aplicada de uma única vez na dentina desmineralizada. A tese foi dividida em dois capítulos que avaliam *in vitro* essas técnicas. O primeiro capítulo avaliou após 6 meses a associação das técnicas em passos separados em dois tipos de sistemas adesivos (convencional de 3 passos e de 2 passos, respectivamente). Concluiu-se que a associação foi capaz de preservar a interface adesiva após o período avaliado somente quando se utilizou o sistema adesivo de 2 passos, apresentando valores de RU estatisticamente superiores ao grupo controle desse mesmo adesivo. O

segundo capítulo avaliou após 12 meses a associação das técnicas em passo único por meio da mistura das duas soluções (CHX e etanol absoluto), utilizando um sistema adesivo convencional de 2 passos. Os resultados mostraram que a mistura das soluções aplicadas em único passo não foi capaz de preservar a interface de união após o período avaliado, além de ter apresentado os piores resultados quando comparada às demais técnicas testadas, com redução dos valores de RU de 55,65%, não sendo, dessa forma, uma opção para melhorar a longevidade das interfaces adesivas.

Palavras-Chave: Etanol; Clorexidina; Adesivos dentinários.

ABSTRACT

The search for adhesive restorations that have greater durability in the oral cavity is constant. Enamel adhesion is already well established and resistant over time. The great challenge is to improve the adhesion of the resin to the dentin, since this substrate is more complex, presenting a greater amount of water in its composition, which directly compromises the adhesion process. In the literature, two major problems related to the degradation of the resin-dentin adhesive interface over time are highlighted: hydrolytic degradation, caused by the deleterious effects of the water inherent to the tooth and the adhesive material used; and the enzymatic degradation caused by the proteolytic enzymes, especially the metalloproteinases (MMP's) present in the dentin structure and that are activated after the acid conditioning. Several proposals have been tested to combat these problems. In the present work, we will focus on two strategies used to improve bond strength to dentin over time: the application of 2% chlorhexidine (CHX) and the ethanol wet-bonding technique (EWBT). The main objective was to evaluate *in vitro* the effects of the association of these two techniques on the bond strength values to dentin after 24h, 6 months and 12 months of storage in water by means of microtensile bond strength test. Two forms of association were used: the first applying the techniques in separate steps, the CHX technique being applied previously to EWBT; and the second by means of an experimental solution handled in a pharmaceutical laboratory composed of 2% CHX diluted in absolute ethanol solution and applied once in the exposed dentin and conditioned with phosphoric acid. The thesis was divided into two chapters that evaluate these techniques *in vitro*. The first chapter evaluated after 6 months the association of the techniques in separate steps in two types of adhesive systems (3-step and 2-step etch-and-rinse). It was concluded that the association was able to preserve the adhesive interface after the period evaluated only when using the 2-

step adhesive system, presenting RU values statistically superior to the control group of this adhesive. The second chapter evaluated after 12 months the association of single-step techniques by mixing the two solutions (CHX and absolute ethanol) using a etch-and-rinse 2-step adhesive system. The results showed that the mixture of solutions applied in a single step was not able to preserve the adhesive interface after the period evaluated, in addition to presenting the worst results when compared to the other techniques tested, with a reduction of RU values of 55.65 %, thus not being an option to improve the longevity of adhesive interfaces.

Key-words: Ethanol. Chlorhexidine. Dentin adhesives.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. CAPÍTULO I	16
ARTIGO: CAN THE USE OF CHLORHEXIDINE ASSOCIATED TO ETHANOL PREVENT THE REDUCTION IN BOND STRENGTH VALUES OF DENTIN ADHESIVE AFTER 6 MONTHS?	16
3. CAPÍTULO II	30
ARTIGO: EFEITO DA CLOREXIDINA 2% DILUÍDA EM ETANOL ABSOLUTO NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA: 12 MESES IN VITRO	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	46
ANEXO 1 (Parecer de aprovação do CEP)	49
ANEXO 2 (Normas da Revista escolhida para o artigo do Capítulo I – Journal of Applied Oral Science).....	52
ANEXO 3 (Normas da Revista escolhida para o artigo do Capítulo II – Journal of Biomedical Materials Research – Part A).....	57
ANEXO 4 (Carta de Aceite do Artigo de Revisão enviado para a Revista Acta Odontológica Venezuelana)	60
ANEXO 5 (Artigo a ser publicado na Revista Acta Odontológica Venezuelana na íntegra)	61

1. INTRODUÇÃO

A estabilidade de união resina-esmalte já está bem consagrada na odontologia adesiva, com excelentes resultados imediatos e em longo prazo. O desafio está na falta de estabilidade de união à dentina, que sofre um decréscimo considerável ao longo do tempo (HOSAKA et al., 2009; SADEK et al., 2010b; LIU et al., 2011; TJÄDERHANE et al., 2013). A hidroflicidade dos adesivos contemporâneos e subsequente hidrólise em decorrência dos efeitos deletérios da água, em combinação com a degradação enzimática das fibrilas colágenas são as duas principais causas dessa instabilidade adesiva ao longo do tempo (SIMÕES et al., 2013; MANSO et al., 2014).

Para facilitar a penetração dos adesivos na estrutura dentinária, – que é naturalmente úmida – e simplificar a técnica adesiva, houve a incorporação de uma grande concentração de monômeros resinosos hidrofílicos tanto nos adesivos convencionais quanto nos autocondicionantes (SIMÕES et al., 2013). No entanto, essa mudança fez com que as interfaces adesivas se tornassem verdadeiras membranas semipermeáveis e as matrizes resinosas ficassem mais instáveis, suscetíveis à sorção de água e hidrólise com o passar do tempo (YIU et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2012).

A presença da água no interior da dentina condicionada com o ácido fosfórico é necessária para impedir o colapso das fibrilas colágenas. No entanto, essa água deve ser removida durante o processo adesivo, pois ela é a principal responsável pelas falhas nas interfaces adesivas, causando plastificação dos componentes resinosos, o que compromete as propriedades mecânicas (HOSAKA et al., 2009; OSORIO et al., 2010).

O conceito da técnica da adesão úmida por etanol (TAUE) surgiu com o intuito de substituir a água da dentina desmineralizada por etanol (SADEK et al., 2007). Essa técnica é capaz de reidratar a matriz colágena, ocasionar uma pequena contração das fibrilas colágenas e aumentar os espaços interfibrilares, melhorando a penetração dos

adesivos (OSORIO et al., 2010). Além disso, os monômeros resinosos hidrofílicos e hidrofóbicos são solúveis em etanol, o que previne a separação de fases e permite que o monômero hidrofóbico também penetre adequadamente na dentina desmineralizada, tornando a camada híbrida mais resistente aos efeitos deletérios da água, combatendo assim o problema da degradação hidrolítica (HOSAKA et al., 2009; SADEK et al., 2010a; SADEK et al., 2010b; OSORIO et al., 2010).

A TAUE clássica promove uma saturação gradual da dentina desmineralizada com soluções crescentes de etanol, iniciando em 50%, seguidas de 70, 80, 95 e 100% (SADEK et al., 2010a; SADEK et al., 2010b; GUIMARÃES et al., 2012). No entanto, essa técnica demanda um tempo clínico muito prolongado, o que a torna pouco atrativa e aplicável clinicamente, sendo necessário buscar estratégias mais simplificadas de saturação (CADENARO et al., 2009; HOSAKA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2013; YESILYURT et al., 2015; BARROS et al., 2016).

A aplicação prévia de clorexidina (CHX) é outra estratégia bastante difundida para minimizar a degradação da interface resina-dentina ao longo do tempo (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007). O digluconato de CHX é um agente antimicrobiano de largo espectro capaz de inibir alguns tipos de enzimas endógenas conhecidas como metaloproteinases (MMPs) mesmo em baixas concentrações (PAPPAS et al., 2005). Essas enzimas, presentes em estado latente na dentina (PASHLEY et al., 2004; HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007), podem acelerar a degradação das fibras de colágeno quando reativadas pelo condicionamento ácido feito antes da aplicação do adesivo (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

Estudos *in vitro* mostraram que a utilização de CHX, após o condicionamento ácido, não comprometeu a adesão dos sistemas adesivos convencionais nem autocondicionantes (DE CASTRO et al., 2003; HEBLING et al., 2005; CARRILHO et

al., 2007). Foi demonstrado ainda que a aplicação de CHX aumentou significativamente a integridade da camada híbrida em um ensaio clínico de seis meses (HEBLING et al., 2005).

Embora as duas técnicas tenham demonstrado sua eficácia na preservação da interface adesiva ao longo do tempo, separadamente não são capazes de impedir totalmente a degradação pelas duas causas principais. O uso associado dessas técnicas pode trazer maiores benefícios na durabilidade da união resina-dentina, no entanto poucos trabalhos abordaram essa associação, bem como não existe na literatura uma padronização de técnicas que demonstre o seu efeito sinérgico. Por essa razão, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da TAUE e da aplicação da CHX associadas em passos separados ou misturadas em um único passo na resistência de união resina-dentina imediata e tardia, em dois tipos de sistemas adesivos convencionais: de três passos (Adper Scotchbond Multipurpose Plus – SBMP) e de dois passos (Single Bond 2 – SB).

O tema será explorado em dois capítulos. No primeiro capítulo, será apresentado um artigo que aborda um estudo in vitro de 6 meses de acompanhamento, onde as técnicas adesivas foram trabalhadas utilizando-se dois tipos de adesivos convencionais (SBMP e SB), aplicados de forma convencional ou com aplicações prévias de CHX e/ou da TAUE modificada e comparando a ação dessas estratégias na preservação da interface resina-dentina ao longo do tempo. No segundo capítulo, teremos o estudo in vitro por 12 meses de acompanhamento testando CHX e TAUE de forma conjunta aplicadas em sequência ou por meio da aplicação única de uma mistura das duas soluções (clorexidina e etanol) para verificar o seu efeito na resistência de união resina-dentina de um adesivo convencional de dois passos (SB) ao longo do tempo.

2. CAPÍTULO I

Artigo a ser enviado para publicação à revista Journal of Applied Oral Science. Normas da revista disponíveis no Anexo 2.

CAN THE USE OF CHLORHEXIDINE WITH ETHANOL PREVENT THE REDUCTION IN BOND STRENGTH VALUES OF DENTIN ADHESIVE OVER TIME?

RUNNING TITLE: Chlorhexidine and ethanol - effect on bond strength to dentin

ABSTRACT:

Objective: To analyze the effect of chlorhexidine application (CHX) and ethanol-wet bonding technique (EWBT) on bond strength (BS) of dentin after six months on two etch-and-rinse adhesives: ScotchBond Multipurpose Plus (SBMP) and Single Bond 2 (SB). Methods: Sixty-four third molars were assigned to eight groups (n = 8), according to the type of adhesive (SBMP or SB) and adhesive technique (Control, CHX, EWBT, or CHX+EWBT). After adhesive application and resin composite build-ups, bonded teeth were sectioned in beams for microtensile bond strength test after 24 h and 6 months of storage. Data analysis was performed by ANOVA-3 factors and Tukey posthoc tests ($\alpha=0.05$). Results: Significant differences were found in the three factors - adhesive (p = 0.004), technique (p = 0.012), and time (p <0.001), and in the adhesive vs. technique interaction (p=0.006). SB presented significantly higher BS than SBMP with the CHX+EWBT association (p=0.006). CHX+EWBT behaved similar to the control and other techniques in the SBMP groups and better than the control in the SB group (p = 0.041). CHX, EWBT, and CHX+EWBT were able to preserve the BS after 6 months in SB, while there was a significant decrease in the SBMP BS with EWBT and

CHX+EWBT. Conclusion: The association of CHX+EWBT preserved the resin-dentin BS after 6 months only for the SB adhesive, and had higher bond strength than its control group, demonstrating the effectiveness of the technique in maintaining the durability of the adhesive interface. This association in SBMP or more hydrophobic adhesives is not recommended.

Keywords: Ethanol. Chlorhexidine. Dentin adhesives.

1. INTRODUCTION

The current challenge in adhesive dentistry is to maintain resin-dentin bond stability over time. There is evidence that the degradation that occurs at this interface is a result of the combined effects of degradation of the demineralized dentin substrate by the hydrolysis of its unprotected collagen fibrils due to incomplete penetration of the adhesive into the hybrid layer^{9,10,23} and its resinous components by water sorption and hydrolysis.^{2,5,12,19,25}

Studies show that chlorhexidine application (CHX) right after acid conditioning is capable of inhibiting the metalloproteinases enzymes (MMPs) and cysteine cathepsins present in the dentin and activated by the acid, that are responsible for the hydrolysis of collagen fibers, leading to greater interface stability over time.^{3,9,13,25}

On the other hand, hydrolytic degradation of the resinous components due to the hydrophilic character of this interface and incomplete penetration of the adhesive resinous monomers inside the demineralized dentin still is a problem.^{15,16} The ethanol-wet bonding technique (EWBT) was created to combat this problem. In the classical technique, dentin is saturated by five different and increasing ethanol concentrations, followed by the application of a "hydrophobic experimental primer" and a hydrophobic adhesive, making the hybrid layer less hydrophilic and more resistant to degradation

over time.^{19,20} However, the prolonged time taken to reach saturation and high technique sensitivity make this alternative clinically unfeasible.^{1,12}

Many protocols have arisen to simplify EWBT,^{1,14,15} as well as to associate this technique with the application of CHX, in order to minimize both problems of interface degradation.^{11,13,22} However, little is known about the beneficial effects of this association, mainly in coronal restorations; besides, there is no defined protocol that presents satisfactory results in terms of bond stability over time that be clinically applicable. Thus, this study aimed to test in vitro a new protocol of EWBT, associated with the application of CHX, using two etch-and-rinse adhesives systems (3-steps and 2-steps). The null hypothesis tested were: 1- there is no difference in the resin-dentin bond strength when using these associated protocols or the water-wet bonding technique; 2- there is no difference in the bond strength values when using the association in different adhesive systems; and 3- the association CHX+EWBT is not capable of preserving the bond strength over time.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1- Sample preparation:

Sixty-four healthy human third molars were used in a reviewed protocol and approved by the Research Ethics Committee (n^o 1.073.571). The sample size was carried out basing on the previous pilot study data. The teeth were stored in 0.1% thymol solution at 40°C until the moment of use. The crowns of the teeth were sectioned with a diamond disk attached to the cutting machine (ISOMET 1000 - Buehler, Illinois, USA) and the remaining enamel islands on the occlusal surfaces were removed with 120 and 180-grit water sandpapers, respectively. The peripheral edges of the enamel were also removed with a # 4137 diamond bur (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil) at

high speed with constant irrigation. The enamel-free, exposed dentin surfaces were polished with 600-grit water sandpaper for 20 s to standardize the smear layer. Each tooth was conditioned with 37% phosphoric acid (FGM, Joinville, SC, BR) for 15 s, rinsed with water for the same duration, and excess water was removed with absorbent paper.

2.2- Adhesive procedures:

The specimens were equally and randomly distributed into 8 groups (n = 8) according to the adhesive type (Adper Scotchbond Multipurpose Plus / 3M ESPE, St. Paul, MN, USA [SBMP]; or Single Bond 2 / 3M ESPE, St. Paul, MN, USA [SB]) and the technique was used after acid etching (Table 1). The "hydrophobic experimental primer" used only for the SBMP adhesive was prepared by diluting 2 ml of 3-step SBMP (3M ESPE) in absolute ethanol corresponding to 10% mass⁵. After the homogenization of the substances in a tube shaker (Phoenix, model AP56) for 60 s, the mixture was stored in a bottle under refrigeration to prevent its direct contact with light until the moment of its use. For saturation of the dentin with ethanol, only two concentrations of the ethanol solutions were used: 50% and 100%. After the adhesive procedure for each group, resin composite blocks (Z350XT, 3M-ESPE) were built-up on the bonded surfaces (three increments of 2 mm each) and were individually light-cured for 40s (DEEMILED Curing light; Kerr) at a light intensity of 800 mW/cm², measured on a radiometer (Demetron LC Curing Light, Kerr, Orange, CA, USA). The experimental units were stored in distilled water at 37°C for 24 h.

Table 1. Instructions for use according to the technique and adhesive applied.

Technique	Adhesive	
	SBMP	SB
Control	1- hydrophilic primer active for 20 s and air-drying for 5 s 2- adhesive (step 3) e light curing for 10 s.	1- adhesive active for 20 s and air-drying for 5 s 2- light curing for 10 s.
CHX	1- chlorhexidine 2% active for 60 s 2- dentin blotting with absorbent paper 3- hydrophilic primer for 20 s and air-drying for 5 s 4- adhesive (step 3) and light curing for 10 s.	1- chlorhexidine 2% active for 60 s 2- dentin blotting with absorbent paper 3- adhesive for 20 s and air-drying for 5 s 4- light curing for 10 s
EWBT	1- ethanol 50% 10 s active and 10 s passive 2- ethanol 100% 10 s active and 10 s passive 3- “hydrophobic experimental primer” active for 20 s and air-drying for 5 s 4- adhesive (step 3) and light curing for 10 s.	1- ethanol 50% 10 s active and 10 s passive 2- ethanol 100% 10 s active and 10 s passive 3- adhesive active for 20 s and air-drying for 5 s 4- light curing for 10 s.
CHX+EWBT	1- chlorhexidine 2% active for 60 s 2- dentin blotting with absorbent paper 3- ethanol 50% 10 s active and 10 s passive 4- ethanol 100% 10 s active and 10 s passive 5- “hydrophobic experimental primer” active for 20 s and air-drying for 5 s 6- adhesive (step 3) and light curing for 10 s.	1- chlorhexidine 2% active for 60 s 2- dentin blotting with absorbent paper 3- ethanol 50% 10 s active and 10 s passive 4- ethanol 100% 10 s active and 10 s passive 5- adhesive active for 20 s and air-drying for 5 s 6- light curing for 10 s.

2.3- Procedures for microtensile bond strength testing (μ TBS)

After 24 h, each experimental unit was fixed with sticky wax to a device and taken to the cutting machine (ISOMET 1000 - Buehler, Illinois, USA), where two cutting sequences were performed - longitudinal and perpendicular to each other - to obtain the sample in beams with a rectangular section area of approximately 0.9 (\pm 0.05)

mm². The number of beams lost prematurely was recorded. The beams of each tooth were divided equally and randomly into 2 groups to be tested at different times: immediate, and after 6 months of their storage in distilled water at 37°C.

Each beam was individually measured with a digital caliper and attached to a device for μ TBS with cyanoacrylate glue gel, to be subjected to stress under tension in a universal testing machine (Instron 3342, Canton, USA), at a crosshead speed of 1.0 mm/min until failure, recording the charge in N (Newton) and converting to MPa. The failures were evaluated by a stereoscopic magnifying glass (Kozo Optical and Electronical instrumental, Nanjing, Jiangsu, China) with a magnification of 40 x and classified as: adhesive or mixed (A), cohesive in dentin (CD), and cohesive in the resin (CR).

2.4- Statistical analysis

The data were collected and analyzed using SigmaPlot 13.0 (Systat Software Inc, 2014). Premature failures were not included in the data. After confirming the normality of the data (Shapiro-Wilk), the 3-factor ANOVA test, and Tukey's post hoc comparison were performed to examine the effects of the adhesive type, adhesive technique, storage period, as well as the interaction of these three factors on bond strength (BS) with an $\alpha=5\%$.

3. RESULTS

The average and standard deviation of the BS of each group, according to the treatment type, adhesive, and storage time are presented in Table 2.

Statistical analysis of the data showed that all three factors were significant: adhesive ($p = 0.004$), technique ($p = 0.012$), and time ($p < 0.001$). A significant

interaction was also observed between the "adhesive" and "technical" factors ($p = 0.006$). However, the interaction of the three factors was not significant ($p > 0.05$).

Regarding the adhesive, SB was better than SBMP ($p=0.004$). In relation to the technique, CHX+EWBT behaved similar to the control and other techniques ($p > 0.05$) in the SBMP groups and better than the control of the SB group ($p = 0.041$). In relation to the time, CHX, EWBT, and CHX+EWBT were able to preserve the BS after 6 months in SB ($p > 0.05$), while there was a decrease in the BS of SBMP when using EWBT and CHX+EWBT after the same period. Regarding the interaction adhesive vs. technique, SB presented higher BS than SBMP when using the association CHX+EWBT ($p = 0.006$) or EWBT ($p = 0.002$).

In Table 3, the average area of the beams and types of failure (%) in each group, after each storage time, are described. In both the periods, there was a predominance of adhesive failures.

Table 2. Means, standard error and % of reduction of the bond strength (Mpa) according to the treatments applied.

Types of treatment	SBMP		% reduction	SB		% reduction	p*
	24h	6m		24h	6m		
Control	46.09 ± 8.16 ^{A,a}	39.10 ± 8.00 ^{A,a}	15,17	43.13 ± 6.19 ^{A,a}	32.30 ± 11.34 ^{B,b}	25,11	0.167
CHX	41.52 ± 9.43 ^{A,a}	35.61 ± 5.79 ^{A,a}	14,23	45.27 ± 8.26 ^{A,a}	39.92 ± 10.17 ^{A,B,a}	11,82	0.209
EWBT	36.24 ± 8.95 ^{A,a}	22.82 ± 4.84 ^{B,b}	37,03	43.85 ± 10.45 ^{A,a}	36.82 ± 11.18 ^{A,B,a}	16,03	0.002
CHX+EWBT	44.53 ± 8.01 ^{A,a}	31.23 ± 8.39 ^{A,B,b}	29,87	51.23 ± 13.59 ^{A,a}	41.77 ± 4.68 ^{A,a}	18,47	0.006

CHX = chlorhexidine / EWBT = etanol-wet bonding technique

Different superscript letters represent values significantly different (p<0.05) for SBMP. Uppercase letters compare treatments and lowercase compare storage periods.

Different superscript letters represent values significantly different (p<0.05) for SB. Uppercase letters compare treatments and lowercase compare storage periods.

* p-value corresponding to the comparison between the adhesives (SBMPxSB) for each treatment.

Table 3. Distribution of failure modes (%) at resin-dentin bonded interfaces and mean area of beams after 24h and 6 months of storage.

Groups	Area of beams		%A		%CR		%CD	
	24h	6M	24h	6M	24h	6M	24h	6M
Control (SBMP)	0.85	0.88	85,42	80,00	8,33	11,11	6,25	8,89
CHX (SBMP)	0.92	0.93	96,30	82,70	1,85	15,38	1,85	1,92
EWBT (SBMP)	0.89	0.91	92,60	91,53	3,70	8,47	3,70	0,00
CHX+EWBT (SBMP)	0.89	0.88	84,48	90,16	6,90	8,20	8,62	1,64
Control (SB)	0.88	0.90	94,00	90,00	4,00	10,00	2,00	0,00
CHX (SB)	0.89	0.90	91,11	81,13	2,22	18,87	6,67	0,00
EWBT (SB)	0.89	0.91	89,58	81,48	6,25	16,67	4,17	1,85
CHX+EWBT (SB)	0.87	0.92	86,79	80,36	13,21	16,07	0,00	3,57

Failure modes: A= adhesive failure or mixed; CR= cohesive failure in composite resin; CD= cohesive failure in dentin.

4. DISCUSSION

The results of the present study do not support the first and second null hypothesis tested, since statistically significant differences were found among the proposed protocols and the conventional technique, as well as between adhesive systems. When CHX was used in combination with EWBT in SB adhesive, it showed higher BS in comparison to SBMP and the conventional SB technique after six months. On the other hand, the third null hypothesis was partially accepted, because the association of the techniques was not capable of preserving the BS in SBMP, but only in SB.

The degradation of the resin-dentin bond has been demonstrated in several *in vitro*^{3,7,8,23} and *in vivo* studies.^{4,10} Some studies show that the application of CHX at 2% before the polymer adhesion process in the dentin substrate does not negatively interfere in the immediate and late adhesive performance^{8,18} of the resinous materials, which is in agreement with the findings of this study, that also demonstrated the preservation of BS over time for SBMP and SB ($p > 0.05$), with the lowest reduction percentage seen in the evaluation after 6 months (14.23% - SBMP and 11.82% - SB) when compared to the other groups.

The EWBT is used in order to decrease the hydrophilicity of the demineralized dentin and make it more compatible with hydrophobic monomers and impart strength to hydrolytic degradation over time.^{15,17,20,21,24} In the present study, the EWBT using the SB adhesive showed similar results to the control group ($p > 0.05$). However, when analyzing the effect of EWBT on SBMP, values lower than the control group were observed ($p < 0.05$), demonstrating a negative effect for the conventional three-step technique.

Some factors in the EWBT could influence the results of the μ TBS, such as solution concentration and saturation time. Tests performed with ethanol 100%, without increasing concentration applications,^{13,14,19,20,22} presented equal^{13,14} or lower values^{19,20,22} than the control group. Meanwhile, tests performed with classical (50, 70, 80, 95, and 100%)^{15,19,20} or

reduced progressive application of ethanol (50% and 100%)¹ presented BS values similar to the control group.

The saturation time of the EWBT is quite varied in the scientific researchs, with applications of 20s,²⁴ 30s,¹⁴ 40s,¹ 60s,^{13,15,22,26} and 210s.^{5,19} Although the latter have effective results, they have no clinical value due to the greater time demand, being better a faster technique and to be effective in dentin saturation, such as the one used in this study (40s), that reduced the time and partially maintained the gradual ethanol saturation technique, preserving the adhesive interface after six months for SB adhesive.

Yesilyurt et al.²⁶ (2015) suggest that EWBT, especially the simplified one, cannot dehydrate the demineralized dentin completely, making the residual water interfere in the penetration of the resinous monomers, mainly the hydrophobic ones, besides interfering in the polymerization of the adhesive and causing over time plasticization of this interface, which is more susceptible to degradation over time. Perhaps this explains the worse results found in the present study in the SBMP groups when the protocols involving ethanol were followed.

The effects of the association of techniques (CHX + EWBT) on the BS have been investigated, and the techniques applied separately have shown favorable results regarding the stability of resin-dentin bond over time.^{12,13,22} It is plausible that there could be a synergism between the two, improving the longevity of the adhesive restorations by the associated technique. In the present study, this association was favorable to the stability of the adhesive interface, presenting the best values of BS after 24 hours and after 6 months of storage, with preservation of this interface over time only for SB ($p > 0.05$), being higher than the conventional technique with the same adhesive ($p < 0.05$). However, SBMP presented the worst results of BS in the associated technique ($p < 0.05$).

It is speculated that there is inhibition of the MMPs and reduction of the hydrolytic degradation by the associated technique in function of time, due to the best BS values in the

results of 6 months²² and 1 year¹³ of the works that tested the associated techniques. In the study in question, the association of the techniques was higher only than the conventional technique of SB, which was not capable of avoiding degradation of the bond interface after 6 months ($p < 0.05$). However, the association of the techniques in the SBMP group did not avoid the reduction in the BS to dentin, having one of the largest percentages of reduction (29.87%), only losing to EWBT in the same adhesive (37.03% of reduction).

With the results of the present research, it is possible to observe that many factors may influence the degradation process of the resin-dentin interface over time, e.g., adhesive types, involved monomers and associated techniques. These should be further investigated in order to establish a satisfactory protocol for the preservation of the adhesive interface that can be used in the dental clinic.

5. CONCLUSION

CHX and EWBT, when applied separately or together, were capable of preserving the resin-dentin BS 6 months after, only for the SB adhesive. In addition, CHX+EWBT in SB showed higher BS than its control group after the follow-up period, demonstrating the effectiveness of the technique in maintaining the durability of the adhesive interface. This association in SBMP or more hydrophobic adhesives is not recommended.

REFERENCES

1. Araújo JF, Barros TA, Braga EM, Loretto SC, Silva e Souza PAR, Silva e Souza MH. One-year evaluation of a simplified ethanol-wet bonding technique: a randomized clinical Trial. Braz Dent J. 2013; 24(3): 267-72.

2. Barros LO, Apolonio FM, Loguercio AD, Saboia VPA. Resin-Dentin Bonds of Etch-and-Rinse Adhesives to Alcohol-saturated Acid-etched Dentin. *J Adhes Dent* 2013; 15: 333-340.
3. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent*. 2009; 34(4): 379-83.
4. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent*. 2007; 32(2):107-11.
5. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di Lenarda R, Carrilho M, et al. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. *Dent Mater*. 2009; 25(1): 39-47.
6. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent*. 2009; 37(2): 108-14.
7. Carrilho MR, Carvalho RM, de Góes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res*. 2007a; 86(1): 90-94.
8. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Breschi NL, Mazzoni A, Tjäderhane L, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater*. 2010; 26: 779–785.
9. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007b; 86(6): 529-33.
10. Carrilho MRO, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 90(1): 373-80.

11. Cecchin D, de Almeida JF, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC. Influence of chlorhexidine and ethanol on the bond strength and durability of the adhesion of the fiber posts to root dentin using a total etching adhesive system. *J Endod.* 2011; 37(9):1310-15.
12. Ekambaram M, Yiu CK, Matinlinna JP, King NM, Tay FR. Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bond to sound and caries-affected dentine. *J Dent.* 2014; 42(6): 709-19.
13. Guimarães LA, Almeida JCF, Wang L, D'Alpino PHP, Garcia FCP. Effectiveness of immediate bonding of etch-and-rinse adhesives to simplified ethanol-saturated dentin. *Braz Oral Res.* 2012; 26(2):177-82.
14. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009; 88(2): 146-51.
15. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011; 90(8): 953-68.
16. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent.* 2007; 20(1): 7-20.
17. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004; 83(3): 216-21.
18. Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjäderhane L, Pashley DH, Tay FR. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater.* 2010a; 26(4): 380-6.

19. Sadek FT, Mazzoni A, Breschi L, Tay FR, Braga RR. Six-month evaluation of adhesives interfaces created by a hydrophobic adhesive to acid-etched ethanol-wet bonded dentine with simplified dehydration protocols. *J Dent.* 2010b; 38(4): 276-83.
20. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater. Res A.* 2008; 84(1): 19-29.
21. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater.* 2009; 25(8): 1050-7.
22. Simões DMS, Basting RT, Amaral FLB, Turssi CP, França FMG. Influence of chlorhexidine and/or ethanol treatment on bond strength of an etch-and-rinse adhesive to dentin: an in vitro and in situ study. *Oper Dent.* 2014; 39(1): 64-71.
23. Soares CJ, Pereira CA, Pereira JC, Santana FR, do Prado CJ. Effect of chlorhexidine application on microtensile bond strength to dentin. *Oper Dent.* 2008; 33: 183-8.
24. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, et al. Bonding BisGMA to dentin- a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86: 1034-1039.
25. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - a review. *Dent Mater.* 2013; 29: 999-1011.
26. Yesilyurt C, Ayar MK, Yildirim T, Akdag MS. Effect of simplified ethanol-wet bonding on dentin bonding durability of etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater J.* 2015; 34(4): 441-8.

3. CAPÍTULO II

Artigo a ser enviado para a revista Journal of Biomedical Materials Research Part A, cujas normas estão disponíveis no Anexo 3.

EFEITO DA CLOREXIDINA 2% DILUÍDA EM ETANOL ABSOLUTO NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA: 12 MESES IN VITRO.

TÍTULO CURTO: Clorexidina em etanol – resistência de união à dentina e longevidade adesiva.

AUTORES: Joyce Figueira de Araújo¹, José Roberto Bauer², Darlon Martins Lima²

¹Doutoranda em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís (MA) Brasil.

²Professor Associado I, do Curso de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís (MA) Brasil.

Correspondência: Joyce Figueira de Araújo. PPGO, Universidade Federal do Maranhão. Av. dos Portugueses, 1966 – Campus Bacanga. CEP: 65080-805 – São Luís – MA. Email: joycefal@hotmail.com

Fonte de financiamento: nada a declarar

Conflito de interesses: nada a declarar

RESUMO:

Objetivo: avaliar o efeito da aplicação prévia de clorexidina a 2% (CHX) diluída em etanol absoluto (ET), na resistência de união (RU) à dentina de um adesivo convencional de dois passos (Single Bond 2 - SB) após 12 meses de armazenamento *in vitro*. Metodologia: Quarenta e oito terceiros molares humanos hígidos foram distribuídos em seis grupos (n=8), de acordo com o tratamento da superfície dentinária. Após a aplicação da técnica adesiva e restauração com resina composta (Z350XT-3M ESPE), os dentes foram seccionados em palitos (0,9 mm²) e submetidos ao teste de microtração após 24h e 12 meses de armazenamento. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA-2 fatores e Tukey ($\alpha=0,05$). Resultados: Diferenças significantes foram encontradas nos fatores técnica ($p<0.001$) e tempo ($p<0.001$). Os valores de RU resina-dentina do grupo da CHX a 2% diluída em ET foram os piores, quando comparados aos demais grupos ($p<0.05$). Além disso, essa mistura não foi capaz de preservar a RU resina-dentina após 12 meses ($p=0.0011$). Conclusão: A solução única de CHX a 2% diluída em ET não teve um efeito positivo na preservação da durabilidade de união à dentina. Dessa forma, esse tipo de associação não garante melhora na longevidade clínica das restaurações.

Palavras-chave: Clorexidina. Etanol. Adesivos dentinários. Longevidade. Degradação da interface.

1. INTRODUÇÃO

Ainda que a evolução dos sistemas adesivos tenha melhorado o desempenho da união resina-dentina nessas restaurações,^{1,2} diversos estudos relatam com frequência o significativo aumento da degradação da interface de união à dentina ao longo do tempo, o que não é observado na união ao esmalte, que é bem estabelecida e duradoura.^{1,3-6}

Diversas alternativas têm sido propostas para diminuir a degradação ao longo do tempo das interfaces de união resina-dentina e aumentar a longevidade clínica das restaurações.^{1,7} Dentre elas, a aplicação de clorexidina (CHX)^{3,4,8-10} e a técnica da adesão úmida por etanol (TAUE)^{6,11-15} são duas opções interessantes, visto que elas atuam cada uma em um dos dois principais problemas relacionados à degradação da interface com o passar do tempo, que é a degradação enzimática pela ativação das enzimas endógenas proteolíticas e a degradação hidrolítica pela presença de água na camada híbrida, respectivamente.⁷

Há evidências científicas de que o digluconato de CHX a 2%, quando aplicado previamente ao procedimento adesivo, resulta em valores de RU mais estáveis ao longo do tempo.^{3,4,11,16,17} Essa estabilidade tem sido atribuída à ação antagonista da CHX às enzimas proteolíticas como as metaloproteinases (MMPs) e catepsinas, liberadas na dentina desmineralizada pelo prévio condicionamento com ácido fosfórico durante os procedimentos adesivos.^{3,10,18}

Por outro lado, a TAUE tem demonstrado resultados satisfatórios no combate à degradação hidrolítica sofrida pela camada híbrida, reduzindo a quantidade de água residual e seus efeitos deletérios ao longo do tempo.^{6,12-14} A substituição da água por etanol torna a interface resina-dentina menos hidrofílica e mais resistente à degradação hidrolítica, além de prevenir a separação de fases nos sistemas adesivos, visto que os monômeros hidrofóbicos são solúveis em etanol e conseguem penetrar mais facilmente na camada híbrida, tornando-a mais hidrofóbica, com menor vulnerabilidade à sorção de água e plasticização da resina.^{5,7,15,19,20}

A literatura aponta vários estudos *in vitro*^{4,6,10,13,14,17} e *in vivo*^{9,15-17,21} avaliando isoladamente as vantagens da utilização da clorexidina e do etanol na preservação da integridade mecânica da interface de união resina-dentina. Todavia, estudos que avaliem a associação das técnicas em passos separados, assim como sua aplicação simultânea em único passo com o intuito de reduzir o tempo clínico, são escassos na literatura. Além disso, há uma

grande variabilidade nos estudos em relação ao tipo de produto, concentração, forma e tempo de aplicação,^{1,20,22-24} dificultando a análise dos resultados.

Por essa razão, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da associação da CHX a 2% diluída em etanol absoluto (ET) na resistência de união (RU) resina-dentina de um sistema adesivo convencional simplificado. As hipóteses nulas testadas foram: 1- não há diferença na RU resina-dentina das interfaces tratadas com a associação de CHX a 2% diluída em ET, em relação às demais técnicas adesivas testadas; 2- CHX 2% diluída em ET e aplicada em passo único não é capaz de preservar a resistência de união após 12 meses de armazenamento *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Preparação das amostras:

Quarenta e oito terceiros molares humanos hígidos (armazenados em solução de timol a 0,1% a 4^oC) foram randomicamente selecionados do banco de dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão e usados após aprovação do comitê de ética local (n^o 1.073.571). O esmalte oclusal dos dentes foi removido horizontalmente por meio de um disco diamantado acoplado à máquina de corte (ISOMET 1000 – Buehler, Illinois, EUA) e as ilhas de esmalte remanescentes foram removidas com lixas d'água de granulação 120 e 180, respectivamente. As superfícies dentinárias foram examinadas em lupa estereoscópica (Kozo Optical and Electronical instrumental, Nanjing, Jiangsu, China) para confirmar a ausência de esmalte. A camada de *smear layer* da superfície dentinária foi padronizada com lixa d'água de granulação 600 por 20 s. Após o condicionamento com ácido fosfórico a 37% (FGM, Joinville, SC, BR) por 15 s, lavagem por 15 s e remoção do excesso de água com papel absorvente, as amostras foram randomicamente divididas em seis grupos experimentais (n=8), de acordo com o tratamento prévio da superfície dentinária (Tabela 1).

Tabela 1. Instruções de uso de acordo com a técnica e adesivo utilizados.

Grupos	Tratamento da superfície dentinária
Controle	Adesivo ativo por 20 s, jato de ar por 5 s e polimerização por 10 s.
CHX 2%	Clorexidina 2% ativa por 60 s, remoção do excesso de umidade, adesivo por 20 s, jato de ar por 5 s e polimerização por 10 s
TAUE 50/100%	Etanol 50% 10 s ativo e 10 s passivo, etanol 100% 10 s ativo e 10 s passivo, adesivo por 20 s, jato de ar por 5 s e polimerização por 10 s
CHX 2% + TAUE 50/100%	Clorexidina 2% ativa por 60 s, remoção do excesso de umidade com papel absorvente, etanol 50% 10 s ativo e 10 s passivo, etanol 100% 10 s ativo e 10 s passivo, adesivo ativo por 20 s, jato de ar por 5 s e polimerização por 10 s
TAUE 100%	Etanol 100% ativo por 60 s, adesivo ativo por 20 s, jato de ar por 5 s e polimerização por 10 s
CHX 2% em ET	Clorexidina 2% em etanol absoluto ativa por 60 s, adesivo ativo por 20 s, jato de ar por 5 s e polimerização por 10 s

2.2- Procedimentos adesivos:

Para a saturação da dentina com etanol, foram utilizadas duas concentrações diferentes de etanol - 50% e 100%, aplicadas de acordo com o grupo correspondente. A solução experimental CHX 2% em ET foi feita adicionando 2% em peso de digluconato de CHX em 100% de ET sob agitação. Nenhuma precipitação de CHX foi observada após o preparo da solução e apenas um único frasco foi preparado para todo o experimento. O sistema adesivo utilizado em todos os grupos foi o Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, USA).

Após os procedimentos adesivos, a resina composta nanoparticulada Z350XT (3M-ESPE) foi inserida em três incrementos de 2mm, fotoativados individualmente por 40s, por meio de uma luz LED com intensidade de 800mW/cm² (DEEMILED Curing light; Kerr), aferida em radiômetro (Demetron LC Curing Light, Kerr, Orange, CA, EUA). As amostras foram armazenadas em água destilada a 37°C por 24 h.

2.3- Procedimentos para os testes de microtração

Após 24h, cada amostra foi fixada em um dispositivo levado à máquina de corte (ISOMET 1000 – Buehler, Illinois, EUA) e seccionada em duas sequências de cortes – longitudinais e perpendiculares entre si – para obtenção de palitos com área de seção retangular de aproximadamente $0,9 (\pm 0,05) \text{ mm}^2$. Metade dos palitos de cada dente foi randomicamente selecionada para o teste imediato, e a outra metade para o teste após 12 meses de armazenamento em água destilada a 37°C .

Cada palito foi medido individualmente com paquímetro digital, fixado com cola de cianoacrilato gel em uma garra e sujeito ao estresse sob tensão em uma máquina de ensaios universal (Instron 3342, Cantom, EUA), com velocidade de 1,0 mm/min até a ruptura do palito, registrando a carga em N (Newton) e convertendo para MPa. As falhas adesivas foram avaliadas em lupa estereoscópica (Kozo Optical and Electronical instrumental, Nanjing, Jiangsu, China) com aumento de 40 x e classificadas em: adesiva ou mista (A), coesiva em dentina (CD) e coesiva em resina (CR).

2.4- Análise estatística

Os efeitos dos seis tratamentos e dos dois períodos de armazenamento foram avaliados pelo teste ANOVA 2 fatores e Tukey post hoc (SigmaPlot 13.0, Systat Software Inc.), após confirmação da normalidade dos dados (Shapiro-Wilk). As perdas prematuras dos palitos durante o processo de corte não foram incluídas nos dados. O nível de significância e o poder do teste foram predefinidos em 5% e 80%, respectivamente.

3. RESULTADOS

3.1 – Análise da resistência de união

A Tabela 2 mostra os valores da RU de cada grupo conforme o tratamento de superfície aplicado e o tempo de armazenamento testado. Os resultados do teste ANOVA-2

fatores mostraram que não houve interação significativa entre estes dois fatores ($p>0.05$). No entanto, diferenças significantes foram encontradas nos fatores técnica ($p<0.001$) e tempo ($p<0.001$) individualmente.

Em relação à técnica, a utilização da CHX a 2% diluída em ET aplicada na superfície dentinária em único passo apresentou os piores valores de RU ($p<0.05$), em comparação a todos os demais grupos. Quando a CHX 2% foi aplicada em associação à TAUE, em passos separados, além de ser superior à CHX 2% em ET, também apresentou RU resina-dentina estatisticamente maior que o grupo controle ($p=0.008$) e o grupo TAUE 100% ($p=0.005$). Os demais grupos se comportaram de maneira semelhante ao grupo controle ($p>0.05$).

Em relação ao tempo, CHX 2% diluída em ET não foi capaz de preservar a RU resina-dentina após 12 meses de armazenamento *in vitro* ($p=0.001$). Apenas os grupos da CHX 2% e da associação CHX 2%+TAUE foram capazes de preservar a RU ao longo do tempo ($p>0.05$). A técnica convencional também não foi capaz de evitar a degradação da interface adesiva no período avaliado ($p=0.018$).

3.2- Análise do modo de falhas

A área média dos palitos e os tipos de falhas (%) em cada grupo, após cada tempo de armazenamento estão descritas na tabela 3. Em ambos os períodos houve uma predominância de falhas adesivas, entretanto, observou-se um aumento no percentual de falhas coesivas em resina para os grupos CHX 2%+TAUE (28.57%) e CHX 2% (25%) após 12 meses.

Tabela 2. Médias, desvios-padrão e porcentagem de redução da resistência de união (Mpa) de acordo com os tratamentos aplicados.

Tipos de Tratamento	SB		% de redução	p*
	24h	12m		
Controle	43.13±6.19 ^{AB,a}	28.62±11.01 ^{B,b}	33.64	0.0186
CHX 2%	45.27±8.26 ^{A,a}	38.40±12.35 ^{AB,a}	15.18	0.1295
TAUE 50%/100%	43.85±10.45 ^{AB,a}	34.85±8.24 ^{AB,b}	20.53	0.0014
CHX 2%+TAUE 50%/100%	51.23±13.59 ^{A,a}	44.84±6.45 ^{A,a}	12.47	0.2157
TAUE 100%	41.95±10.09 ^{AB,a}	28.96±9.8 ^{B,b}	30.97	0.0403
CHX 2% em ET 100%	30.35±8.29 ^{B,a}	13.46±7.36 ^{C,b}	55.65	0.0011

CHX = clorexidina / TAUE = técnica da adesão úmida por etanol / ET = etanol
Diferentes letras sobrescritas representam valores significativamente diferentes (p<0.05). Letras maiúsculas comparam tratamentos e letras minúsculas comparam períodos de armazenamento.
* Valor de p correspondente à comparação entre os períodos de armazenamento para cada tipo de tratamento

Tabela 3. Distribuição dos tipos de falhas (%) dos grupos testados e média da área dos palitos em cada período de armazenamento

Grupos	Área Palitos		%A		%CR		%CD	
	24h	12M	24h	12M	24h	12M	24h	12M
Controle	0.88	0.89	93.88	80	4,08	18	2.04	2
CHX 2%	0.89	0.90	89.80	73.21	6.12	25	4.08	1.79
TAUE 50/100%	0.89	0.89	89.36	90.38	6.38	9.62	4.26	0.00
CHX 2%+TAUE 50/100%	0.87	0.89	86.54	67.86	13.46	28.57	0.00	3.57
TAUE 100%	0.85	0.84	78.18	96.37	16.36	3.63	5.46	0.00
CHX 2% em ET 100%	0.89	0.90	91.84	100	6.12	0.00	2.04	0.00

Tipos de falhas: A= falha adesiva ou mista; CR= falha coesiva em resina; CD= falha coesiva em dentina.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a utilização da CHX 2% diluída em ET demonstrou os piores resultados de resistência de união após 12 meses, quando comparada com as demais técnicas testadas, enquanto que a associação das técnicas CHX 2%+TAUE em passos separados

obteve maior RU quando comparada à técnica convencional e à técnica da TAUE isoladamente, rejeitando assim a primeira hipótese nula. A segunda hipótese nula foi aceita, já que a CHX 2% diluída em ET não foi capaz de preservar a interface adesiva resina-dentina.

O intuito de associar as duas técnicas é obter os benefícios de ambas na preservação da interface adesiva. Poucos estudos na literatura utilizando a associação da CHX ao etanol em dentina coronária são encontrados,^{20,22,24} não havendo padronização nas técnicas. No presente estudo foram testados os dois tipos de associações existentes: em passos separados ou em uma solução única. Apenas a associação em passos separados preservou a RU após 12 meses, além de apresentar valores de RU superiores ao grupo controle.

Os resultados do presente estudo para a associação das técnicas em passos separados não corroboram com os resultados obtidos por Simões et al.²², que testaram CHX+TAUE em passos separados, por 6 meses, e observaram que essa associação não foi capaz de conter a degradação da interface de união in vitro. As possíveis razões para tal diferença são a ordem de aplicação e a sequência de concentração de etanol utilizadas em Simões et al. (2013), que testaram etanol 100%, seguido da CHX, e no presente trabalho a CHX foi aplicada previamente à TAUE, e esta, foi feita com duas concentrações (50 e 100%). Dessa maneira, pode-se supor que a utilização ascendente do etanol após a solução aquosa de CHX possa ter contribuído para uma melhor evaporação da água inerente da dentina e da água adicionada durante a aplicação da CHX, favorecendo a estabilidade da interface de união, com apenas 12,47% de redução nos valores de RU após 12 meses.

Para reduzir a sensibilidade da técnica e o tempo clínico por meio da diminuição do número de passos, seria interessante tratar a dentina desmineralizada de uma única vez com uma solução contendo CHX e etanol, usufruindo assim dos benefícios de ambas as técnicas. No entanto, no presente estudo, o grupo da CHX 2% diluída em ET foi o que apresentou os piores valores de RU resina-dentina, quando comparado aos demais grupos, mostrando que a

associação em passo único não teve efeito positivo na estabilidade da interface adesiva. Esses achados são discordantes de Ekambaram et al.²⁰, que também avaliaram uma mistura de CHX 2% em ET e, após 12 meses, observaram preservação da RU e redução da nanoinfiltração interfacial; e de Manso et al.²⁴, que testaram CHX 1% em ET e houve estabilidade na RU após 15 meses no grupo do adesivo convencional de dois passos.

Para melhor entendimento dos resultados discordantes entre os estudos citados e o presente trabalho, é importante destacar alguns pontos. Primeiramente, os trabalhos que testaram a solução única contendo CHX e etanol, utilizaram o diacetato de clorexidina.^{20,24} No presente trabalho, optou-se por testar o digluconato de clorexidina, que é a apresentação comercial mais comumente utilizada na clínica odontológica. A grande diferença entre os dois é a forma de apresentação, sendo o diacetato em pó e o digluconato em forma líquida. Como o digluconato de CHX já é disponibilizado em solução aquosa, não é possível a retirada do solvente (água purificada) para a manipulação da fórmula, portanto deve sempre ser considerada uma pequena quantidade de água purificada ($\pm 4g/50$ ml da fórmula). Pode-se inferir que a aplicação dessa mistura tenha resultado em maior quantidade de água e/ou etanol residual ao redor das fibras colágenas expostas, impedindo a penetração adequada do adesivo e da própria CHX, formando uma camada híbrida mais fraca, o que explicaria os valores de RU mais baixos após 24h apenas e principalmente após 12 meses, em decorrência da maior vulnerabilidade dessa interface adesiva à degradação hidrolítica e enzimática.

Outro ponto a ser discutido é a forma de aplicação das soluções. Nos dois trabalhos^{20,24} as amostras foram imersas nas soluções contendo a mistura CHX e etanol absoluto, enquanto que no presente estudo, a aplicação foi feita por meio do microbrush, simulando o procedimento clínico. É possível que essa forma de aplicação não tenha sido suficiente para substituir a água da dentina e nem levar a CHX para o interior da dentina

desmineralizada, não alcançando os principais objetivos: inibir MMP's e evitar o efeito deletério da água, tornando, assim, a camada híbrida mais instável.

O colapso das fibras colágenas é mais passível de ocorrer na saturação simplificada com etanol¹², enquanto que na saturação gradual esse problema não é observado^{13,14,25}. Além disso, há maior chance de permanecer a água residual devido ao menor tempo de saturação para a substituição da água por etanol, o que pode comprometer a interface de união em decorrência de plasticização resinosa, reduzida polimerização e dificuldade de penetração adesiva.⁵ Na mistura CHX 2% em ET, a TAUE foi feita da maneira mais simplificada e essa pode ter sido uma das razões para a redução significativa nos valores de resistência de união após 12 meses (55.65%).

No presente estudo, a aplicação da CHX, sozinha ou em associação à TAUE em passos distintos teve efeito positivo na RU ao longo do tempo. A redução de falhas adesivas e aumento das falhas coesivas nesses grupos confirmam seus benefícios, visto que essa configuração indica que a interface de união resina-dentina está mais resistente e estável ao longo do tempo, devendo seu uso ser estimulado na odontologia restauradora adesiva. Por outro lado, a TAUE, bem como sua associação com a CHX em um único passo, devem ser mais investigadas, de modo a verificar sua relevância clínica e sua efetividade na melhora da durabilidade da interface adesiva, bem como definir um protocolo mais adequado para a execução das mesmas e que seja viável clinicamente.

5. CONCLUSÃO

A solução única de CHX a 2% diluída em ET não teve um efeito positivo na preservação da durabilidade de união à dentina. Dessa forma, esse tipo de associação não garante melhora na longevidade clínica das restaurações. No entanto, quando a CHX e a

TAUE foram utilizadas em passos separados, houve a preservação da interface adesiva resina-dentina.

REFERÊNCIAS

1. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res.* 2011; 90(8): 953-68.
2. Carvalho RM, Manso AP, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater.* 2012; 28(1): 72-86.
3. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR *et al.* Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007; 86(1): 90-94.
4. Loguercio AD, Hass V, Gutierrez MF, Luque-Martinez IV, Szezs A, Stanislawczuk R, Bandeca MC, Reis A. Five-year Effects of Chlorhexidine on the In Vitro Durability of Resin/Dentin Interfaces. *J Adhes Dent.* 2016; 18(1): 35-42.
5. Yesilyurt C, Ayar MK, Yildirim T, Akdag MS. Effect of simplified ethanol-wet bonding on dentin bonding durability of etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater J.* 2015; 34(4):441-8.
6. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, Tay FR, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009; 88(2): 146-51.
7. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - a review. *Dent Mater.* 2013; 29: 999-1011.
8. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005; 84(8):741-6.

9. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent.* 2009; 34(4): 379-83.
10. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri Jr A, Tay FR, Dorigo ES, Pashley DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year *in vitro* study. *Dent Mater.* 2010; 26: 320-325.
11. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garrett LV, et al. Bonding BisGMA to dentin- a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86: 1034-1039.
12. Osorio E, Toledano M, Aguilera FS, Tay FR, Osorio R. Ethanol wet-bonding technique sensitivity assessed by AFM. *J Dent Res.* 2010; 89(11):1264-1269.
13. Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjäderhane L, Pashley DH, et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater.* 2010a; 26(4):380-6.
14. Sadek FT, Mazzoni A, Breschi L, Tay FR, Braga RR. Six-month evaluation of adhesives interfaces created by a hydrophobic adhesive to acid-etched ethanol-wet bonded dentine with simplified dehydration protocols. *J Dent.* 2010b; 38(4):276-83.
15. Araújo JF, Barros TA, Braga EM, Loretto SC, Silva e Souza PAR, Silva e Souza MH. One-year evaluation of a simplified ethanol-wet bonding technique: a randomized clinical Trial. *Braz Dent J.* 2013; 24(3): 267-72.
16. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118: 411-416.

17. Gunaydin Z, Yazici AR, Cehreli ZC. In Vivo and In Vitro Effects of Chlorhexidine pretreatment on immediate and aged dentin bond strengths. *Oper Dent.* 2016; 41(3): 258-267.
18. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, *et al.* Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004; 83(3): 216-21.
19. Souza Jr MHS, Ferreira RO, Araújo JF, Barros TAF, Braga EMF, Loretto SC. Is the ethanol wet-bonding technique a promising one? *Int J Odontostomat.* 2015; 9(3): 463-468.
20. Ekambaram M, Yiu CK, Matinlinna JP, King NM, Tay FR. Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bond to sound and caries-affected dentine. *J Dent.* 2014; 42(6):709-19.
21. Mortazavi V, Samimi P, Rafizadeh M, Kazemi S. A randomized clinical trial evaluating the success rate of ethanol wet bonding technique and two adhesives. *Dent Res J (Isfahan).* 2012; 9(5):588-94.
22. Simões DMS, Basting RT, Amaral FLB, Turssi CP, França FMG. Influence of chlorhexidine and/or ethanol treatment on bond strength of an etch-and-rinse adhesive to dentin: an in vitro and in situ study. *Oper Dent.* 2014; 39(1):64-71.
23. Stanislawczuk R, Pereira F, Muñoz MA, Luque I, Farago PV, Reis A, Loguercio AD. Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin-dentine interfaces. *J Dent.* 2014; 42: 39-47.
24. Manso AP, Grande RH, Bedran-Russo AK, Reis A, Loguercio AD, Pashley DH, Carvalho RM. Can 1% chlorhexidine diacetate and ethanol stabilize resin-dentin bonds? *Dent Mater.* 2014; 30(7):735-41.
25. Sadek FT, Pashley DH, Ferrari M, Tay FR. Tubular occlusion optimizes bonding of hydrophobic resins to dentin. *J Dent Res.* 2007; 86(6): 524-528.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando toda pesquisa executada em torno das estratégias TAUE e CHX para melhorar a durabilidade da união resina-dentina, é importante ressaltar alguns pontos:

- 1- Tanto a TAUE quanto a CHX demonstraram de alguma maneira interferir na degradação da interface adesiva ao longo do tempo. No entanto, é fundamental que se observe qual a melhor forma de se aplicar cada uma das técnicas no intuito de obter melhores resultados, uma vez que tempo de aplicação, concentração e modo de associação, bem como o tipo de adesivo, influenciam diretamente nos resultados finais;
- 2- O pré-tratamento com CHX a 2% por 60 s foi capaz de preservar a resistência de união ao longo do tempo, mantendo valores de RU estatisticamente semelhantes aos valores obtidos após 24h tanto no SBMP quanto no SB;
- 3- A TAUE, aplicada de maneira isolada utilizando dois tipos de saturação (50 e 100%) ou em associação com a CHX, demonstrou influenciar negativamente na durabilidade da interface adesiva quando se utilizou a técnica convencional de três passos com o SBMP;
- 4- A associação TAUE + CHX em passos separados mostrou os melhores resultados na resistência de união resina-dentina no grupo do SB, sendo capaz de preservar a interface adesiva após 6 e 12 meses, sendo superior à técnica convencional do mesmo adesivo, que não impediu a degradação ao longo do tempo;
- 5- A simplificação demasiada da TAUE, com aplicação única de 100% de etanol se mostrou ineficaz na preservação da interface adesiva, com uma redução significativa na resistência de união após 12 meses (30.97%);

6- A solução única contendo CHX e etanol absoluto não demonstrou resultados satisfatórios após 12 meses, apresentando uma queda brusca nos valores de RU após o período avaliado, com o maior percentual de redução entre os grupos (55.65%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.F, BARROS, T.A.; BRAGA, E.M.; LORETTO, S.C.; SILVA E SOUZA, P.A.R.; SILVA E SOUZA, M.H. One-year evaluation of a simplified ethanol-wet bonding technique: a randomized clinical Trial. **Braz Dent J**, v. 24, n. 3, p. 267-72. 2013.

BARROS, T.A.F.; ARAÚJO, J.F.; BRAGA, E.M.F.; SILVA E SOUZA, R.P.A.; LORETTO, S.C.; SOUZA JR, M.H.S. Ethanol-wet bonding technique: 18-month clinical evaluation. **Int J Odontostomat**, v. 10, n. 2, p. 267-276. 2016.

CADENARO, M.; BRESCHI, L.; RUEGGEBERG, F.A.; AGEE, K.; DI LENARDA, R.; CARRILHO, M.; et al. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. **Dent Mater**, v. 25, n. 1, p. 39-47. 2009.

CARRILHO, M.R.; CARVALHO, R.M.; DE GOES, M.F.; DI HIPÓLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F.R.; et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **J Dent Res**, v. 86, n. 1, p. 90-4. 2007.

CHAUSSAIN-MILLER, C.; FIORETTI, F.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. **J Dent Res**, v. 85, n. 1, p. 22-32. 2006.

DE CASTRO, F.L.; DE ANDRADE, M.F.; DUARTE JUNIOR, S.L.; VAZ, L.G.; AHID, F.J. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. **J Adhes Dent**, v. 5, n. 2, p. 129-38. 2003.

EKAMBARAM, M.; YIU, C.K.; MATINLINNA, J.P.; KING, N.M.; TAY, F.R. Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bond to sound and caries-affected dentine. **J Dent**, v. 42, n. 6, p. 709-19, jun. 2014.

GUIMARÃES, L.A.; ALMEIDA, J.C.F.; WANG, L.; D'ALPINO, P.H.P.; GARCIA, F.C.P. Effectiveness of immediate bonding of etch-and-rinse adhesives to simplified ethanol-saturated dentin. **Braz Oral Res**, v. 26, n. 2, p. 177-82. 2012.

HOSAKA, K.; NISHITANI, Y.; TAGAMI, J.; YOSHIYAMA, M.; BRACKETT, W.W.; AGEE, K.A.; TAY, F.R.; PASHLEY, D.H. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. **J Dent Res**, v. 88, n. 2, p. 146-51. 2009.

LIU, Y.; TJÄDERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; LI, N.; MAO, J.; et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. **J Dent Res**, v. 90, n. 8, p. 953-68. 2011.

MANSO, A.P.; GRANDE, R.H.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; REIS, A.; LOGUERCIO, A.D.; PASHLEY, D.H.; CARVALHO, R.M. Can 1% chlorhexidine diacetate and ethanol stabilize resin-dentin bonds? **Dent Mater**, v. 30, n. 7, p. 735-41. 2014.

OSORIO, E.; TOLEDANO, M.; AGUILERA, F.S.; TAY, F.R.; OSORIO, R. Ethanol wet-bonding technique sensitivity assessed by AFM. **J Dent Res**, v. 89, n. 11, p. 1264-1269. 2010.

PAPPAS, M.; BURNS, D.R.; MOON, P.C.; COFFEY, J.P. Influence of a 3-step tooth disinfection procedure on dentin bond strength. **J Prosthet Dent**, v. 93, n. 6, p. 545-50. 2005.

PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R.M.; et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res**, v. 83, n. 3, p. 216-21. 2004.

SADEK, F.T.; CASTELLAN, C.S.; BRAGA, R.R.; MAI, S.; TJÄDERHANE, L.; PASHLEY, D.H.; et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. **Dent Mater**, v. 26, n. 4, p. 380-6. 2010a.

SADEK, F.T.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; TAY, F.R.; BRAGA, R.R. Six-month evaluation of adhesives interfaces created by a hydrophobic adhesive to acid-etched ethanol-wet bonded dentine with simplified dehydration protocols. **J Dent**, v. 38, n. 4, p. 276-83, Apr. 2010b.

SIMÕES, D.M.S.; BASTING, R.T.; AMARAL, F.L.B.; TURSSI, C.P.; FRANÇA, F.M.G. Influence of chlorhexidine and/or ethanol treatment on bond strength of an etch-and-rinse adhesive to dentin: an in vitro and in situ study. **Oper Dent**, v. 39, n. 1, p. 64-71. 2014.

TJÄDERHANE, L.; NASCIMENTO, F.D.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; TERSARIOL, I.L.S.; GERALDELI, S.; et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - a review. **Dent Mater**, v. 29, p. 999-1011. 2013.

YESILYURT, C.; AYAR, M.K.; YILDIRIM, T.; AKDAG, M.S. Effect of simplified ethanol-wet bonding on dentin bonding durability of etch-and-rinse adhesives. **Dent Mater J**, v. 34, n. 4, p. 441-8. 2015.

YIU, C.K.; KING, N.M.; CARRILHO, M.R.; SAURO, S.; RUEGGERBERG, F.A.; PRATI, C. et al. Effect of resin hydrophilicity and temperature on water sorption of dental adhesive resins. **Biomaterials**, v. 27, p. 1695-703. 2006.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE APLICAÇÃO PRÉVIA DE CLOREXIDINA E SATURAÇÃO DA DENTINA POR ETANOL NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO IMEDIATA E TARDIA DE UM SISTEMA ADESIVO HIDRÓFOTO

Pesquisador: Darlon Martins Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32270814.2.0000.5087

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISA CLINICA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.073.571

Data da Relatoria: 29/04/2015

Apresentação do Projeto:

A manutenção da estabilidade da união dos sistemas adesivos à dentina tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores. Para superar as dificuldades de adesão ao substrato úmido e manter certa simplicidade de aplicação e uso, avanços nas técnicas restauradoras e modificações químicas destes materiais têm sido propostas. A incorporação de uma grande concentração de monômeros resinosos hidrofílicos tanto nos adesivos convencionais quanto nos autocondicionantes, devido à característica naturalmente úmida da dentina, cria membranas semipermeáveis e matrizes resinosas instáveis que são capazes de promover sorção de água e sofrer hidrólise com o tempo. Especula-se que a degradação que ocorre na interface adesiva dentina/resina composta seja o resultado de um efeito combinado da degradação de seus componentes resinosos, pela sorção de água e hidrólise, e da degradação do substrato dentinário desmineralizado exposto pelo condicionamento ácido e não protegido pela resina, que também sofre hidrólise das suas fibras colágenas. A degradação das fibrilas de colágeno pode ser acelerada pela reativação de enzimas endógenas conhecidas como metaloproteinases (MMPs), presentes em estado latente na dentina^{10,16,21}. Situações como a liberação de ácidos no desenvolvimento da cárie e condicionamento ácido prévio à aplicação do adesivo podem reativá-las¹². O digluconato de clorexidina é um agente antimicrobiano de largo espectro capaz de inibir alguns tipos de MMPs

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 1.073.571

mesmo em baixas concentrações²⁰. Estudos in vitro mostraram que a utilização de clorexidina, após o condicionamento ácido, não comprometeu a adesão dos sistemas adesivos convencionais nem autocondicionantes^{10,13,16}. Foi demonstrado que a aplicação de clorexidina, conhecida por ser um inibidor de MMP de largo espectro, aumentou significativamente a integridade da camada híbrida em um ensaio clínico de seis meses¹⁶. Outro problema presente na interface adesiva é a penetração incompleta dos sistemas adesivos e sua susceptibilidade à degradação hidrolítica ao longo do tempo devido à hidrofobicidade da camada híbrida formada. Para contornar tal situação, tem sido pesquisada uma nova técnica adesiva, onde agentes adesivos mais hidrófobos são aplicados em uma dentina saturada por etanol, os quais são menos susceptíveis à sorção de fluídos intra e extra-orais. Essa técnica conhecida como técnica da adesão úmida por etanol (TAUE) tem mostrado resultados laboratoriais favoráveis^{18,25}. Na TAUE, a dentina é saturada por meio da aplicação

progressiva de concentrações crescentes de etanol, seguida pela aplicação de um primer hidrofóbico e posteriormente de um adesivo hidrofóbico, formando uma camada híbrida menos hidrofílica e mais resistente à degradação hidrolítica e à ação das MMP. A saturação da dentina por meio da substituição da água por etanol mantém a matriz colágena expandida e transforma o substrato mais compatível à penetração de monômeros hidrófobos, seja aumentando a resistência e efetividade da adesão^{2,15}. Embora as duas técnicas tenham demonstrado benefícios para a interface adesiva, não se conhece se a associação delas teria um efeito sinérgico ou contrário.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

Estabelecer a influência da associação da aplicação prévia da clorexidina à técnica da saturação da dentina por etanol na resistência de união adesiva, por meio da análise do teste de microtração.

Objetivo Secundário:

Avaliar a resistência de união imediata da interface adesiva após a associação das técnicas adesivas com clorexidina e dentina saturada por etanol; Avaliar a resistência de união tardia (06 meses e um ano) da interface adesiva após a associação das técnicas adesivas com clorexidina e dentina saturada por etanol; Determinar a falha estrutural ocorrida na interface adesiva por meio de análise em Microscopia Eletrônica de Varredura

(MEV).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 1.073.571

Contaminação pelo manuseio de material biológico por parte da equipe de pesquisadores.

Benefícios:

Aprimorar técnicas de adesão à dentina com intuito de aumentar a resistência de união resina-dentina aos efeitos da água e das enzimas hidrolíticas. Melhorar a durabilidade das restaurações adesivas desenvolvidas clinicamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de relevância para a área e está bem estruturada e com uma boa base técnica científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatórios estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Recomendações:

Não existem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO LUIS, 21 de Maio de 2015

Assinado por:
FRANCISCO NAVARRO
(Coordenador)

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

ANEXO 2

The **Journal of Applied Oral Science** is committed in publishing the scientific and technologic advances achieved by the dental and speech-language pathology and audiology communities, according to the quality indicators and peer reviewed material, with the objective of assuring its acceptability at the local, regional, national and international levels. The primary goal of The Journal of Applied Oral Science is to publish the outcomes of original investigations as well as invited case reports and invited reviews in the field of Oral Sciences, with emphasis in dentistry, speech-language pathology and audiology, and related areas.

This Journal adopts Creative Commons license CC-BY:

"This license lets others distribute, remix, tweak, and build upon your work, even commercially, as long as they credit you for the original creation. This is the most accommodating of licenses offered. Recommended for maximum dissemination and use of licensed materials."

There is no fee to authors for submitting to the JAOS nor Article Processing Charge(APC).

Form and preparation of manuscripts

1 Presentation of the Manuscript

1.1 Structure of the manuscript

Cover page (must be submitted as a supplementary file through the online submission system) which should contain only:

- Title of the manuscript in English.
- Names of the authors in direct order with their respective degrees and affiliations in English.
- Full address of the corresponding author, to whom all correspondence should be addressed, including fax and phone number as well as e-mail address.

1.2 Text

- The paper must be previously translated or reviewed by professional or company responsible for English language. The costs of this service will be under the authors' responsibility. Authors with English as native language must submit as supplementary file a signed letter taking responsibility for the quality of the English language and editing of the text.
- Title of the manuscript and subtitle, if necessary, in English.
- Abstract: should comprise at most 300 words, highlighting a little introduction, objective, material and methods, results and conclusions.
- Key words: (words or expressions that identify the contents of the manuscript). The authors are referred to the list of subjects of the "Index Medicus" and DeCS (Health Sciences Descriptors available at <http://decs.bvs.br/l/homepagei.html>). Authors must use periods to separate the key words, which must have the first letter of the first word in capital letters. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.

- Introduction: summary of the rationale and proposal of the study including only proper references. It should clearly state the hypothesis of the study.
- Material and Methods: the material and the methods are presented with enough detail to allow confirmation of the findings. Include city, state and country of all manufacturers right after the first appearance of the products, reagents or equipments. Published methods should be referred to and briefly discussed, except if modifications were made. Indicate the statistical methods employed, if applicable. Please refer to item 3 for ethical principals and registration of clinical trials.
- Results: presents the outcomes in a logical sequence in the text, tables and illustrations. Data contained in tables and illustrations should not be repeated in the text, and only important findings should be highlighted.
- Discussion: this should emphasize the new and important aspects of the study and the resulting conclusions. Any data or information mentioned in the introduction or results should not be repeated. Findings of other important studies should be reported. The authors should point out the implications of their findings as well as their limitations.
- Conclusion(s) (if any).
- Acknowledgments (when appropriate). Acknowledge those who have contributed to the work. Specify sponsors, grants, scholarships and fellowships with respective names and identification numbers.
- References (please refer to item 2.3)

2 TECHNICAL NORMALIZATION

The manuscript should be typed as follows: 1.5 spacing in 11 pt Arial font, with 3-cm margins at each side, on an A4 page, adding up to at most 15 pages, including the illustrations (graphs, photographs, tables, etc). The authors should keep a copy of the manuscript for possible requests.

2.1 Illustrations and Tables

2.1.1 The illustrations (photographs, graphs, drawings, charts, etc.), regarded as figures, should be limited to the least amount possible and should be uploaded in separate files, consecutively numbered with Arabic numbers according to the order they appear in the text.

2.1.2 Photographs should be sent in original colors and digitized in .jpg or tif formats with at least 10 cm width and at least 300 dpi. These illustrations should be provided in supplementary files and not inserted in the Word document.

2.1.3 The corresponding legends for figures should be clear, concise and typed at the end of the manuscript as a separate list preceded by the corresponding number.

2.1.4 The tables should be logically arranged, consecutively numbered with Arabic numbers. The legend shall be placed on the top of the tables. Tables should be open in the right and left laterals.

2.1.5 Footnotes should be indicated by asterisks and restricted to the least amount possible.

2.2 Citation of the Authors

Citation of the authors in the text may be performed in two manners:

1) Just numeric: " and interfere with the bacterial system and tissue system^{3,4,7-10}".
References must be cited in a numeric ascending order within the paragraph.
2) or alphanumeric

- one author - Silva²³ (1986)
- two authors - Silva and Carvalho²⁵ (1987)
- three authors - Ferreira, Silva and Martins²⁷ (1987)
- more than three authors- Silva, et al.²⁸ (1988)
- Punctuation characters such as periods and commas must be placed after the numeric citation of the authors. Ex: Ferreira³⁸.

2.3 References

The references must follow the "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver" available at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

2.3.1 All references must be cited in the text. They should be alphabetically ordered by the last name of the author and numbered in increasing order accordingly. The order of citation in the text should follow these numbers. Abbreviations of the titles of the international journals cited should follow the Index Medicus/MEDLINE.

2.3.2 Personal communications and unpublished data with no publication date must not be included in the reference list.

2.3.3 Abstracts, monographs, dissertations and theses will not be accepted as references.

2.3.4 The names of all authors should be cited up to 6 authors; in case there are more authors, the 6 first authors should be cited, followed by the expression ", et al.", which must be followed by "period" and should not be written in italics. Ex: Uhl, et al.

2.3.5 At most 30 references may be cited, except for invited reviews by the Editor-in-Chief.

Examples of references:

Book

Melberg JR, Ripa LW, Leske GS. Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical applications. Chicago: Quintessence; 1983.

Book chapter

Verbeeck RMH. Minerals in human enamel and dentin. In: Driessens FCM, Woltgens JHM, editors. Tooth development and caries. Boca Raton : CRC Press; 1986. p.95-152.

Papers published in journals

Wenzel A, Fejerskov O. Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surfaces of extracted third molars. Caries Res. 1992;26:188-93.

Papers with more than 6 authors

The first 6 authors are cited, followed by the expression ", et al."

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood - leukemia in Europe after Chernobyl : 5 years follow-up. Br J Cancer. 1996;73:1006-12.

Papers without authors' names

Seeing nature through the lens of gender. Science. 1993;260:428-9.

Volume with supplement and/ or Special Issue

Davidson CL. Advances in glass-ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2006;14(sp. Issue):3-9.

Entire issue

Dental Update. Guildford 1991;18(1).

The authors are fully responsible for the correctness of the references.

3 ETHICAL PRINCIPLES AND REGISTRATION OF CLINICAL TRIALS

3.1 Experimental procedures in humans and animals

The Journal of Applied Oral Science reassures the principles incorporated in the Helsinki Declaration and insists that all research involving human beings, in the event of publication in this journal, be conducted in conformity with such principles and others specified in the respective ethics committees of authors' institution. In the case of experiments with animals, such ethical principles must also be followed. When surgical procedures in animals were used, the authors should present, in the Material and Methods section, evidence that the dose of a proper substance was adequate to produce anesthesia during the entire surgical procedure. All experiments conducted in human or animals must accompany a description, in the Material and Methods section, that the study was approved by the respective Ethics Committee of authors' affiliation and provide the number of the protocol approval.

3.1.1 Papers presenting **clinical trials** or **clinical studies in human volunteers or in animals** must contain the Ethical Committee approval of the reports of the **results** presented for publication **as mandatory supplementary file**.

3.2 Clinical Trial Registration - International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)

The Journal of Applied Oral Science supports the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) for the registration of clinical trials. The journal recognizes the importance of such initiatives for the registration and international publication of clinical studies with an open access. Therefore, the Journal of Applied Oral Science will publish only those clinical trials that have previously received an identification number, the ISRCTN, validated by the criteria established by the WHO and ICMJE. The WHO defines clinical trials as "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other

biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioral treatments, process-of-care changes, preventive care, etc".

3.2.1 Manuscripts presenting clinical trials in human volunteers must be submitted with the following mandatory supplementary files:

- CONSORT 2010 checklist (<http://www.consort-statement.org/>);
- registration number of the research in a database that meets the requirements of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)
- Suggestions: for Brazilian authors: <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/>
- Suggestions for Brazilian and non-Brazilian authors: <http://www.controlled-trials.com/> (ISRCTN) or <http://prsinfo.clinicaltrials.gov>.

3.3 The Editor-in-Chief and the Editorial Board reserve the right to refuse manuscripts that show no clear evidence that the methods used were not appropriate for experiments in humans or animals.

4 ANY QUERIES SHALL BE SOLVED BY THE Editor-in-Chief AND EDITORIAL BOARD

ANEXO 3

Author Guidelines

Journal of Biomedical Materials Research Part A

Information for Contributors

Aims and Scope

The Journal of Biomedical Materials Research Part A is an international, interdisciplinary, English-language publication of original contributions concerning studies of the preparation, performance, and evaluation of biomaterials; the chemical, physical, toxicological, and mechanical behavior of materials in physiological environments; and the response of blood and tissues to biomaterials. The Journal publishes peer-reviewed articles on all relevant biomaterial topics including the science and technology of alloys, polymers, ceramics, and reprocessed animal and human tissues in surgery, dentistry, artificial organs, and other medical devices. The Journal also publishes articles in interdisciplinary areas such as tissue engineering and controlled release technology where biomaterials play a significant role in the performance of the medical device.

The Journal of Biomedical Materials Research is the official journal of the Society for Biomaterials (USA), the Japanese Society for Biomaterials, the Australasian Society for Biomaterials, and the Korean Society for Biomaterials.

Articles are welcomed from all scientists. Membership in the Society for Biomaterials is not a prerequisite for submission.

1.1.1.1. Instructions for Manuscript Preparation

Manuscript: For optimal production, prepare manuscript text in size 12 font on 8-1/2 x 11 inch page, double-spaced, with at least 1-inch margins on all sides. Text files should be formatted as .doc or .rtf files. Refrain from complex formatting; the Publisher will style your manuscript according to the Journal design specifications. Do not use desktop publishing software such as PageMaker or Quark Xpress or other software such as Latex. If you prepared your manuscript with one of these programs, export the text to a word processing format. Please make sure your word processing programs “fast save” feature is turned off. Please do not deliver files that contain hidden text: for example, do not use your word processor’s automated features to create footnotes or reference lists.

Original Articles should appear in the following order: title page (including authors and affiliations), abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, figure legends. Number pages consecutively starting with the title page as page 1.

Please be sure to submit your illustrations and tables as separate files; the system will automatically create a pdf file of your paper for the reviewers.

Title Page: The name(s) and affiliation of the author(s) should appear only on a separate title page. Please do not mark any other parts of the manuscript with name(s) and affiliation(s) of author(s). Use only a short title on the following pages of the manuscript. Author(s) name(s) should not be used. The paper should be subdivided into the expected classical sections and, if necessary, subsections.

Manuscripts including references (but not figures or tables) should be no longer than 18 pages.

Abstract: A short synopsis (200 words or less) is required for all papers. This synopsis should be carefully prepared, for it is the source of most abstracts. The synopsis should be a summary of the entire paper, not the conclusions alone, and should precede the main body of the paper.

Keywords: The author is requested to supply, below the synopsis, a list of five keywords or phrases that most clearly typify the outstanding points made in the manuscript.

References:

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. Sample references follow:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.
 2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.
 3. Gilmor ML, Rouse ST, Heilman CJ, Nash NR, Levey AI. Receptor fusion proteins and analysis. In: Ariano MA, editor. *Receptor localization*. New York: Wiley-Liss; 1998. p 75-90.
- Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

Figure Legends: Please supply complete captions for all figures. Captions are to appear on a separate page at the end of the manuscript. **Symbols and Equations:** Authors are cautioned to type, wherever possible, all mathematical and chemical symbols, equations, and formulas and to identify in the margin all Greek or unusual symbols the first time they are used (e.g., k , K , x , α). Underline all vector quantities with a wavy line. Use fractional exponents to avoid root signs. When mentioning a material, chemical reagent, instrument or other product, use the generic name only. If further identification (proprietary name, manufacturer's name and address) is required, list it as a footnote.

Tables: Please save Tables separately and supply numbers and titles for all. All table columns should have an explanatory heading. Tables should be submitted as doc or rtf files (it is preferred that tables are prepared using Word's table edit tool).

Illustrations: When preparing digital art, please consider:

Resolution: The minimum requirements for resolution are:

1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs.

300 DPI/PPI for picture-only photographs

600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Formats:

For the editorial review process, GIF and JPEG files are acceptable; upon submission of a revision, TIFF or EPS files will be required. For the editorial review process, color images may be submitted in RGB color; upon revision, CMYK color will be required. Delivery of production-quality files early in the review process may facilitate smooth and rapid publication once a manuscript has been accepted.

Note that these file formats are not acceptable for printing: JPG, GIF, PNG, PCX, PNG, XBM, Word, and Excel. We recommend creating your graphics in Photoshop, Illustrator, or Freehand and importing them into your page applications as TIFFs with all fonts included. Do not scan figures as JPEGs and convert to TIFFs. For further guidance on preparing digital figure files, authors are encouraged to visit <http://cjs.cadmus.com/da/applications.asp>.

Color Illustrations: Color figures are generally printed in the Journal at the author's expense. The publisher will provide cost estimates prior to printing. A limited number of color figures that are of critical importance and that significantly enhance the presentation will be considered for publication at the publisher's expense subject to editorial recommendation. Final decision on publication of color figures will be at the discretion of the Editor. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

Author Alterations or Revisions. It is absolutely necessary to limit alterations to factual and typographical errors. Authors will be charged for revisions, and publication of their work will be delayed. In order to expedite the publication and online posting of articles in Wiley Online Library, JBMR sends page proofs in pdf format via e-mail to the corresponding author's e-mail address. Please follow the instructions in the e-mail; contact names and numbers are given for questions, problems, or if an author wishes to receive a paper proof.

Reprints: Reprints may be ordered at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=JBMA>.

Note to NIH Grantees:

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

ANEXO 4

ACTA ODONTOLÓGICA VENEZOLANA

ÓRGANO OFICIAL DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA-UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Caracas, 19 de enero de 2016

Dra. Araujo, J.F.

Profa. Lago, A.D.N.,

Profa. Lima, D.M.,

Presentes.-

Me complace comunicarles que su trabajo titulado: **“DEGRADACIÓN DE LA UNIÓN RESINA-DENTINA: ¿POR QUÉ SUCEDÉ Y QUÉ ESTRATEGIAS PROPONEN PARA EVITARLA?”**. Fue aceptado para su publicación el 19 de enero de 2016. Este artículo saldrá publicado en el Vol. 53 N° 3 Año 2015.

Recibido para Arbitraje: 05/10/2015

Sin otro particular y agradeciendo su valiosa colaboración, queda de Ustedes,

Atentamente

A handwritten signature in black ink is written over a circular stamp. The stamp contains the text "ACTA ODONTOLÓGICA VENEZOLANA" around the top edge and "UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA" around the bottom edge. In the center of the stamp, there is a stylized logo consisting of the letters "A", "O", and "V" arranged vertically.

J.E. Troconis Ganimez

Director

TG/aa

ANEXO 5

DEGRADACIÓN DE LA UNIÓN RESINA-DENTINA: ¿POR QUÉ SUCEDE Y QUÉ ESTRATEGIAS PROPONEN PARA EVITARLA?

INTERFACE RESIN-DENTIN DEGRADATION: WHY DOES IT HAPPEN? WHAT CAN WE DO TO PREVENT IT?

Recibido para Arbitraje: 05/10/2015

RESUMEN: Los procedimientos adhesivos son actualmente los más utilizados en los procesos de restauración, debido a la gran mejoría de sus propiedades mecánicas y la unión a la estructura dentaria. Aunque existe buen rendimiento clínico, las interfaces adhesivas también presentan falla a lo largo del tiempo, lo que conduce a problemas en la restauración como la microfiltración, la tinción y la sensibilidad dentinaria, comprometiendo así el resultado final. Varios estudios se han desarrollado para identificar las causas de los mecanismos de envejecimiento y el consecuente fracaso de las restauraciones adhesivas y probar nuevas alternativas para reducir al mínimo o incluso evitar la degradación de la unión de interfaz de resina de dentina, especialmente en sistemas adhesivos simplificados. Esta revisión de la literatura tiene como objetivo resaltar las principales causas de la degradación de la interfaz adhesiva a través del tiempo, así como las técnicas probadas en laboratorio y clínicamente destinadas a reducir este problema.

PALABRAS CLAVE: Dentina; Biomimetismo; La permeabilidad de la dentina; Adhesivos de dentina.

ABSTRACT: The bonding procedures are currently the most widely used in restorative procedures, due to the large improvement in their mechanical properties and bonding to tooth structure. Although good clinical performance, the adhesive interfaces also fail over time, which leads to problems in the restoration such as leakage, staining and sensitivities, thus affecting the final result. Several studies have been developed to indicate the causes of aging mechanisms and consequent failure of adhesive restorations and test new alternatives to minimize or even avoid the degradation of resin-dentin bonded interface, mainly in simplified adhesive systems. This literature review aims to highlight the main causes of degradation of the adhesive interface over time, as well as laboratory and clinically tested techniques that aim to reduce that problem.

KEY WORDS: Dentin; Biomimetics; Dentin permeability; Dental adhesives.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los sistemas adhesivos han evolucionado y se han convertido en uno de los principales responsables por las restauraciones adhesivas en el esmalte y la dentina, con resultados inmediatos satisfactorios^{1,2}. No obstante, a pesar de los grandes avances en la tecnología adhesiva, la durabilidad clínica de la interfaz dentina-resina es todavía demasiado corta^{3,4}.

La adhesión a la dentina es menos durable y más compleja que en el esmalte, ya que la dentina es un sustrato con humedad inherente, lo que dificulta la penetración de monómeros hidrófobos contenidos en la formulación de los adhesivos. Además, también tiene una mayor cantidad de componentes orgánicos⁵.

Para hacer los adhesivos más compatibles con la dentina húmeda fueron necesarios algunos cambios en su composición, como la adición de monómeros hidrófilos y/o ácidos, dependiendo del tipo de sistema que está siendo usado (los de grabado independiente o los autograbadores), facilitando así la penetración dentro de las fibras de colágeno desmineralizadas⁶.

La búsqueda de técnicas más simplificadas y rápidas ha estimulado la aparición de sistemas adhesivos simplificados, reduciendo el número de pasos, con los adhesivos de grabado independiente de dos pasos y sistemas autograbadores de un paso^{3,7}. Sin embargo, hubo un aumento de la hidrofiliidad de estos sistemas haciéndolos verdaderas membranas semipermeables, que se tradujo en una mayor degradación de la interfaz adhesiva a lo largo del tiempo, y en consecuencia, el fracaso de la restauración⁸.

Las principales causas de envejecimiento a lo largo del tiempo de las uniones resina-dentina son: la alta hidrofiliidad de los comonomeros^{9,10}; la discrepancia en la profundidad de la desmineralización de la dentina y la penetración del adhesivo^{10,11}; el aprisionamiento de los disolventes y / o agua dentro de la capa híbrida^{6,7}; y la activación de las enzimas proteolíticas presentes en la dentina y la consiguiente degradación de las fibras colágenas por la acción de estas enzimas^{2,12-14}.

Hay muchos intentos de mejorar el desempeño clínico de las restauraciones producidas por la técnica adhesiva, intentando evitar las fallas y la rápida degradación de la interfaz adhesiva^{5,15-17}. Entre las alternativas propuestas, se pueden citar: la aplicación de una capa hidrófoba adicional^{6,18,19}; técnica de adhesión húmeda en etanol^{10,20,21}; aplicación de clorhexidina (CHX) en la dentina desmineralizada^{12,15,22}; y la adición de 10-metacriloxietil

dihidrógeno-fosfato (10-MDP)^{4,23}, zinc^{16,24,25} o biovidrio en la formulación de los adhesivos^{2,8,12}.

El propósito de esta revisión bibliográfica es resaltar las principales causas de la degradación de la interfaz adhesiva a lo largo del tiempo, así como algunas de las estrategias que se están evaluando actualmente para minimizar o incluso evitar este envejecimiento longitudinal, y así poder estimular nuevas investigaciones científicas en torno a estas alternativas para que, en el futuro, puedan aplicarse clínicamente.

REVISIÓN DE LA LITERATURA Y DISCUSIÓN

Se seleccionaron 42 artículos científicos en el período de 2004-2014 en las bases de datos PubMed y Scielo que presentaron investigaciones clínicas y de laboratorio con respecto a la degradación de la interfaz adhesiva. Así, este trabajo se divide en dos partes: causas de la degradación; y estrategias para mejorar la longevidad de la interfaz adhesiva.

1- CAUSAS DE LA DEGRADACIÓN DE LA INTERFAZ ADHESIVA

Se encontraron en la literatura tres causas principales para la degradación de la interfaz de unión resina-dentina: el aumento de la hidrofilia en la capa híbrida; degradación por enzimas proteolíticas; y atrapamiento de disolventes residuales en la interfaz adhesiva.

Según algunos autores, el aumento de la hidrofilia en la capa híbrida puede ser proveniente tanto de la composición de los sistemas adhesivos, principalmente los más simplificados, como de la presencia de agua que queda entre las fibrillas de colágeno desmineralizadas después de la técnica adhesiva convencional^{3,5-7}.

La adición de mayores cantidades de monómeros hidrófilos en los sistemas adhesivos simplificados provoca un aumento de la sorción de agua mediante la capa híbrida formada. Esta alta permeabilidad promueve la degradación hidrolítica a lo largo del tiempo, creando microfallas en la interfaz de unión resina-dentina que pueden conducir a la pérdida de la restauración o la microfiltración secundaria⁶.

Otro problema observado está relacionado con los disolventes incluidos en los actuales sistemas adhesivos simplificados. Estos disolventes facilitan el transporte de monómeros hidrófilos por la red de colágeno desmineralizada^{26,27}. Sin embargo, es fundamental que se produzca la evaporación completa de este disolvente para no interferir en la conversión de los monómeros en polímeros^{6,7}. Desafortunadamente, esta eliminación no se logra por completo, dejando una parte del disolvente o agua intrínseca retenidos dentro de la capa híbrida

formada^{8,26}. Estos dos factores facilitan la degradación de la interfaz, una vez que quedan más susceptibles a los efectos deletéreos del agua y de las enzimas proteolíticas.

El tercer problema descrito en la literatura es la degradación de la interfaz por enzimas proteolíticas, tales como las metaloproteinasas (MMPs) y las catepsinas cisteínas^{11,13}. Los autores informan que los adhesivos convencionales requieren un paso aislado de grabado ácido en la estructura de dentina antes de su aplicación^{6,7}. Se observa que la profundidad de la desmineralización causada por el ácido es típicamente mayor que la penetración de los monómeros adhesivos dentro de la dentina desmineralizada, dejando algunas fibras de colágeno no protegidas^{11,24}. De esta manera, son más susceptibles a las acciones de estas enzimas, que son capaces de hidrolizar ambos componentes de la matriz extracelular como monómeros resinosos hidrófilos^{14,28}.

2- NUEVAS ALTERNATIVAS PARA MEJORAR LA LONGEVIDAD CLÍNICA DE LA INTERFAZ ADHESIVA

Después del descubrimiento de las causas principales de la pérdida de la longevidad de las interfaces adhesivas, estrategias alternativas han comenzado a ser investigadas y desarrolladas para intentar reducir o evitar esa degradación a lo largo del tiempo. A continuación serán analizadas algunas de ellas:

2.1- AUMENTO DEL TIEMPO DE APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS ADHESIVOS:

Para evitar el problema del atrapamiento del disolvente y/o agua en la capa híbrida, se sugiere aumentar el tiempo de aplicación de los sistemas adhesivos para evaporar cualquier disolvente, ya que este proceso puede promover la disminución de la cantidad de disolvente residual y la consiguiente reducción de agua en la capa híbrida²⁹. Cuanto más tiempo se espere para polimerizar el adhesivo, sea de forma pasiva o activa con chorros de aire, mayor cantidad de disolvente se evaporará y mejor será la calidad de la unión, ya que habrá un mayor grado de conversión²⁷.

A pesar de una mejora en la longevidad, esta técnica intenta resolver solamente una de las causas de la degradación. Por lo tanto, se sugiere que sea asociada con otras técnicas que buscan tratar las otras causas del problema.

2.2- APLICACIÓN DE UNA CAPA HIDRÓFOBA ADICIONAL:

Los sistemas adhesivos simplificados, de grabado independiente de dos pasos y autograbadores de un solo paso, son más atractivos para el clínico porque reducen el tiempo de aplicación y sensibilidad de la técnica debido a la reducción de pasos clínicos^{1,7,30}. Sin embargo, hubo un aumento de la hidrofiliidad de estos productos, comprometiendo el desempeño clínico de las restauraciones³⁰. Los adhesivos autograbadores de un solo paso, en particular, son altamente hidrófilos y fallan más rápido en comparación con otros adhesivos con más pasos, presentando una menor resistencia de unión inmediata⁹.

Una forma de combatir la hidrofiliidad de los sistemas adhesivos simplificados, sean de grabado independiente o autograbadores, sería la aplicación de una capa adicional de monómero hidrófobo⁶. Esta aplicación adicional resulta en una capa híbrida más hidrófoba y más sellada, que influye directamente en la durabilidad de la unión⁴. Además, esta capa híbrida es más espesa y uniforme y también más resistente a la degradación hidrolítica, dado que disminuye la permeabilidad de esta interfaz, disminuyendo el libre paso del agua a través de ella¹⁸.

Un estudio clínico aleatorizado¹⁹ usando capa hidrófoba adicional mostró éxito clínico de esta técnica, con aumento en las tasas de retención de las restauraciones adheridas. Es importante destacar que este procedimiento hace con que los sistemas adhesivos simplificados vuelvan a sus formas tradicionales de tres pasos en el sistema de grabado independiente y dos pasos en el sistema autograbador, resultando en un aumento del “tiempo clínico” para la aplicación de los procedimientos adhesivos, lo que puede ser un problema para la difusión de la técnica.

2.3- TÉCNICA DE LA ADHESIÓN HÚMEDA EN ETANOL:

La adhesión resina-dentina es menos durable que la adhesión resina-esmalte, ya que la adhesión a la dentina depende de compuestos orgánicos, además de sufrir interferencias de los fluidos dentinarios llevando a una disminución constante en la resistencia de la unión a lo largo del tiempo, con la consiguiente pérdida de las restauraciones hechas por ambos sistemas adhesivos, de grabado independiente y autograbadores³¹.

Los monómeros hidrófilos, utilizados en los sistemas adhesivos para facilitar la penetración en la dentina húmeda, son susceptibles a la sorción de agua y un rápido deterioro de las propiedades mecánicas²⁰.

Con la prueba de que el componente resinoso hidrófilo de la capa híbrida es el más susceptible a la degradación hidrolítica, disminuyendo la eficacia y durabilidad de las restauraciones adhesivas, se buscó estabilidad de la capa híbrida mediante la aplicación de monómeros más hidrófobos. No obstante, la infiltración de monómeros más hidrófobos en la dentina desmineralizada y húmeda es inviable, ya que los mismos son insolubles en agua, impidiendo, de ese modo su penetración en los espacios fibrilares³¹.

Para alcanzar la penetración de monómeros hidrófobos, como el Bis-GMA, es necesario realizar, con etanol absoluto, la saturación de la dentina desmineralizada. Esto mantendrá la dentina expandida, evitando la ruptura de las fibras de colágeno y permitiendo su posterior infiltración, ya que ese componente es soluble en etanol⁵, surgiendo entonces la Técnica de la Adhesión Húmeda en Etanol (TAHE).

Esta técnica consiste en conducir monómeros hidrófobos al interior de la dentina desmineralizada saturada con etanol. Además de la sustitución del agua dentro de las fibras colágenas desmineralizadas por el etanol, se debe diluir los monómeros hidrófobos con una solución de etanol absoluto, formando la sustancia conocida como “primer hidrófobo”. Esta mezcla es más permeable y compatible a nueva condición de la dentina y crea una capa híbrida más fuerte y más durable³².

Diversos estudios de laboratorio^{20,21,33} fueron desarrollados para probar esta nueva técnica, entre ellos Shin, Yao, Huenergardt, Walker y Wang³³, que obtuvieron en su estudio una adhesión más duradera a través de la técnica de saturación con etanol. Un resultado similar se obtuvo por Sadek, Castellan, Braga, Mai, Tjäderhane, Pashley y Tay²¹, donde la resistencia de la unión adhesiva y la capa híbrida formada por la técnica de la saturación con etanol se ha preservado a lo largo del tiempo.

A pesar de los resultados de laboratorio satisfactorios después de la aplicación de la TAHE, se han realizado pocos estudios clínicos para evaluar su eficacia clínica. Dos trabajos^{10,34} evaluaron clínicamente restauraciones adhesivas hechas por esta técnica y no observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos convencional y TAHE después de 12 meses de acompañamiento.

Un problema presentado por esta técnica es que aumenta el número de pasos clínicos y el tiempo de aplicación, no siendo atractiva para los clínicos que buscan una mayor velocidad en la técnica. Además, se intenta solucionar solamente uno de los problemas relacionados con la degradación, que es la sorción de agua y la degradación hidrolítica, pero no actúa sobre las MMPs.

En vista de esto, más investigaciones acerca de esta técnica deben ser desarrolladas para alcanzar resultados clínicos más satisfactorios y demostrar su superioridad en la preservación de la interfaz a lo largo del tiempo.

2.4- APLICACIÓN DE CLORHEXIDINA:

La degradación de las fibrillas de colágeno se puede acelerar mediante la reactivación de las enzimas endógenas MMPs, presentes en un estado latente en la dentina^{15,22,28}. Situaciones como la liberación de ácidos en el desarrollo de las caries y grabado ácido antes de la aplicación del adhesivo pueden reactivarlas¹⁴.

El digluconato de clorhexidina es un antimicrobiano de amplio espectro que se une a los aminoácidos de la dentina y continúa matando a las bacterias durante varias horas³⁵. Además, es capaz de inhibir ciertos tipos de MMPs incluso en bajas concentraciones^{2,11}.

Los estudios *in vitro* han demostrado que el uso de clorhexidina, después del grabado ácido, no comprometió la adhesión de los sistemas adhesivos de grabado independiente ni autograbadores^{15,22}. Todavía, se demostró que la aplicación de la sustancia antes o después del grabado ácido aumenta la resistencia de unión³⁵.

Después de un ensayo clínico de seis meses comparando la interfaz de unión resina-dentina con o sin la aplicación de la clorhexidina después del grabado ácido, se observó que la integridad de la capa híbrida se mantuvo en el grupo tratado con el agente antimicrobiano, mientras que en el grupo control hubo una desintegración gradual de la red fibrilar²².

Estudios han propuesto la asociación de la aplicación de la clorhexidina con la técnica de adhesión húmeda en etanol, porque de esa manera dos problemas podrían superarse: la degradación hidrolítica y la degradación de las fibras de colágeno a través de la acción de enzimas proteolíticas^{36,37}. Simões, Basting, Amaral, Turssi y França³⁶ no observaron diferencias en la resistencia de la unión *in vitro* o *in situ* cuando se combinaron las dos técnicas; ya Ekambaram, Yiu, Matinlinna, King y Tay³⁷ observaron mejora tanto en la resistencia de la unión como en la nanoinfiltración después de 12 meses en un estudio *in vitro* con combinación de las técnicas.

A pesar de los resultados prometedores, el número de estudios de laboratorio es todavía escaso, por lo que se necesitan más investigaciones sobre esta asociación para ver si realmente hay sinergismo de las técnicas.

2.5- ADICIÓN DE 10-MDP:

Monómeros funcionales ácidos ejercen un papel importante en el desempeño del adhesivo y en las propiedades fisicoquímicas de los adhesivos autograbadores³⁸. Actualmente algunos de estos sistemas tienen en su composición el 10-metacriloxietil dihidrógeno-fosfato, más conocido como 10-MDP, un monómero funcional que es capaz de interactuar con la hidroxiapatita residual mediante conexiones iónicas primarias^{4,11,23}.

Este monómero funcional es formado por un grupo polimerizable de metilmetacrilato, necesario para el endurecimiento del adhesivo, y un grupo funcional ácido (grupo fosfato), que permite la interacción fuerte y estable con el calcio de la hidroxiapatita. Los dos grupos están separados por una cadena de carbono larga²³.

El modo de interacción del 10-MDP la estructura dentaria, mediante conexiones micromecánicas y químicas, se asemeja a la forma en que los ionómeros de vidrio interactúan con sustratos dentales⁴. Este monómero es considerado actualmente el estándar de oro dentro de los sistemas autograbadores³⁸.

El 10-MDP tiene una capacidad relativamente fuerte de descalcificación-adhesión, haciendo que el calcio sea liberado rápidamente para formar sales de monómero-calcio estables, en forma de nanocapas, que se consideran más estables y resistentes a los efectos deletéreos del agua, aumentando así la durabilidad de la interfaz adhesiva²³. Esta mayor resistencia al agua puede atribuirse a su cadena carbónica hidrófoba separadora³⁸.

Sin embargo, a pesar de la adición del 10-MDP en adhesivos autograbadores débiles minimizar la nanoinfiltración y establecer un enlace químico más estable con la hidroxiapatita, es incapaz de evitar la reducción de la resistencia de unión con el paso del tiempo, ya que no elimina por completo la degradación enzimática del colágeno. En este sentido, es necesario tratamiento adicional con otras sustancias inhibitoras, como la CHX, para obtener resultados más duraderos¹¹.

La incompleta impregnación de las fibras de colágeno por monómeros de los sistemas autograbadores puede ocurrir y causar la hidrólisis de la capa híbrida³⁹, a pesar de la infiltración del monómero ser prácticamente simultánea con la desmineralización, lo que reduce significativamente el número de fibras sin protección, así como la nanoinfiltración⁷.

Además, otro problema que conduce a un aumento en la sorción de agua y falla en la interfaz adhesiva es la presencia dentro de la capa híbrida de polímeros MDP no reaccionados con el calcio, tanto en la superficie del esmalte como de la dentina, debilitando la unión³⁹.

2.6- ADICIÓN DE ZINC:

Un efecto obtenido en la presencia de zinc (Zn) en la composición de los sistemas adhesivos convencionales es la inhibición de la desmineralización de la dentina e inducción de su remineralización²⁵. El uso de adhesivos que contienen Zn en su composición puede aumentar la durabilidad de la interfaz de unión resina-dentina, ya que aumenta la resistencia a la degradación por las enzimas MMPs¹⁶.

Un estudio de laboratorio²⁴ comparó un sistema adhesivo de grabado independiente simplificado (grupo control) con otros dos sistemas adhesivos experimentales, también de grabado independiente simplificado, pero que contenían ZnO o ZnCl₂ en su formulación. Después del almacenamiento durante un período de un mes y tres meses, observaron un fracaso estadísticamente significativo en la interfaz resina-dentina del grupo control. La posible conservación en los grupos experimentales puede haber sido por la liberación de iones de Zn, que son inhibidores de las MMPs. También en esta investigación, se observó un aumento en la dureza de la capa híbrida en los adhesivos con Zn, probablemente debido a la precipitación mineral dentro de la matriz orgánica, resultante del proceso de remineralización inducida por el zinc.

Sauro, Osorio, Osorio, Watson y Toledano⁸ observaron que, al añadir un material bioactivo inductor de calcio y fosfato más el Zn, los resultados fueron más satisfactorios en comparación con los adhesivos que contenían solamente el biomaterial en su composición, probablemente debido a la suma de los efectos de Zn tanto en la remineralización como en la protección de las fibras de colágeno de la acción de las MMPs.

Por otro lado, no parece haber beneficios en la adición de Zn en adhesivos autograbadores, probablemente debido a una posible interacción química entre el MDP y el Zn³⁸. En un estudio de laboratorio³⁸ se observó que la adición de nitrato de Zn en la composición de adhesivos autograbadores de dos pasos y un solo paso, que contenían MDP, resultó en una disminución significativa en la resistencia de la unión después de 24 horas y aumento de la nanoinfiltración en la interfaz adhesiva, probablemente debido a tener ocurrido más conexiones entre el Zn-MDP que entre Ca-MDP.

Esta línea parece prometedora, pero más estudios aún necesitan ser hechos para establecer adecuadamente el papel del zinc en la mejora de la longevidad clínica en sistemas adhesivos de grabado independiente.

2.7- ADICIÓN DE MATERIALES BIOACTIVOS - BIOVIDRIOS:

Estudios recientes han apostado en la estrategia de la mineralización biomimética que consiste en la remineralización de las regiones de las fibras de colágeno desmineralizadas debido al grabado ácido y no protegidas después de la imbricación de los adhesivos, con el fin de aumentar la calidad y la durabilidad de las interfaces resina-dentina^{12,17,40}.

El propósito de la adición de materiales bioactivos en la interfaz adhesiva es para remineralizar la región desmineralizada de la capa híbrida mediante la liberación de iones calcio y fosfato, consiguiendo respuesta positiva del tejido dental, con la reducción de la micropermeabilidad a lo largo de la interfaz adhesiva por cristalización de minerales⁸. Por lo tanto, hubo un aumento en las investigaciones en torno a los biomateriales que están liberando iones y que tengan propiedades bioactivas/biomiméticas^{8,13}.

La biomodificación de la dentina se ha investigado como una estrategia terapéutica biomimética para aumentar la resistencia mecánica de la red de colágeno y también controlar las tasas de degradación de los componentes de la matriz extracelular¹³.

La estrategia de la mineralización biomimética parece ocurrir en dos fases: en la primera se forma una fase líquida de fosfato de calcio amorfo, ocupando los espacios nanoscópicos en las fibras de colágeno desmineralizadas. La siguiente fase, una matriz de fosfoproteína se encarga de la deposición de apatita dentro de las fibras de colágeno, mineralizándolas⁴¹.

Estos materiales pueden tener un comportamiento mecánico similar a los cementos de ionómero de vidrio⁴⁰. Por lo tanto, los adhesivos que contienen biovidrio pueden liberar iones de su composición, tales como calcio y fosfato, por el esmalte y la dentina adyacente al material, causando una disminución en la desmineralización causada por la exposición al ácido^{2,42}.

En un estudio *in vitro*⁴⁰ se observó que la liberación continua de iones calcio y fosfato en los adhesivos que recibieron adición de materiales bioactivos indujeron la remineralización de la capa híbrida y recuperaron las propiedades mecánicas de las fibras de colágeno deficientes de mineral, confirmando los beneficios de estos materiales en la durabilidad de la unión resina-dentina.

Como las fibras colágenas que se estabilizan por los cristales de apatita intrafibrilar e interfibrilar en los tejidos mineralizados no se degradan con el tiempo, la remineralización de la capa híbrida por la biomimética parece ser un enfoque lógico para extender la longevidad de las uniones resina-dentina, pero más estudios de investigación deben hacerse antes de proponer esta técnica clínicamente¹².

CONSIDERACIONES FINALES:

Varias estrategias se han investigado en los intentos de aumentar la durabilidad de las interfaces adhesivas resina-dentina, con resultados prometedores. En base a esta revisión de la literatura es posible hacer las siguientes consideraciones:

1- Dentro de sus limitaciones particulares y ventajas en la superación de las causas conocidas de la degradación marginal a lo largo del tiempo, como el aumento de la hidrofilia en la capa híbrida y la degradación por enzimas proteolíticas, las estrategias han demostrado la capacidad de mejorar la durabilidad de la interfaz adhesiva;

2- Es posible que algunas de las técnicas sean utilizadas en asociación para mejorar la longevidad clínica de las restauraciones adhesivas, incluso si se requiere un tiempo mayor de aplicación, y los profesionales de la salud deben tener la percepción de lo que es mejor para su paciente;

3- Se han realizado pocos estudios clínicos para evaluar las técnicas propuestas. Es vital que más investigaciones sean efectuadas tanto en laboratorio como clínicamente para alcanzar la excelencia adhesiva, sea con una técnica específica o combinación de ellas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek BV. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005; 84(2):118-132.
2. Imazato S, Ma S, Chen JH, Xu HH. Therapeutic polymers for dental adhesives: Loading resins with bio-active components. *Dent Mater* 2014;30(1):97-104.
3. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, Dorigo ES. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008;24(1):90-101.
4. Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, De Munck J. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater* 2010;26:e100–e121.
5. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res* 2011;90(8):953-968.
6. Reis A, Carrilho M, Breschi L, Loguercio AD. Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Oper Dent* 2013;38(4):E1-E25.

7. Silva e Souza Jr MH, Carneiro KG, Lobato MF, Silva e Souza PA, de Góes MF. Adhesive systems: important aspects related to their composition and clinical use. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(3):207-14.
8. Sauro S, Osorio R, Osorio E, Watson TF, Toledano M. Novel light-curable materials containing experimental bioactive micro-fillers remineralise mineral-depleted bonded dentine interfaces. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2012;24(8):940-56.
9. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011;27(1):17-28.
10. Araújo JF, Barros TA, Braga EM, Loretto SC, Silva e Souza PAR, Silva e Souza MH. One-year evaluation of a simplified ethanol-wet bonding technique: a randomized clinical trial. *Braz Dent J* 2013;24(3):267-72.
11. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer—A review. *Dent Mater.* 2013;29(10):999-1011.
12. Kim J, Vaughn RM, Gu L, Rockman RA, Arola DD, Schafer TE, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Imperfect hybrid layers created by an aggressive one-step selfetch adhesive in primary dentin are amendable to biomimetic remineralization *in vitro*. *J Biomed Mater Res A* 2010;93(4):1225-34.
13. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CM, Napotilano JG, Nam JW, Leme AA. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater.* 2014;30(1):62-76.
14. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006;85(1):22-32.
15. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res* 2007;86(1):90-4.
16. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR, Toledano M. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *J Dent* 2011;39:148-153.
17. Ryou H, Niu LN, Dai L, Pucci CR, Arola DD, Pashley DH, Tay FR. Effect of biomimetic remineralization on the dynamic nanomechanical properties of dentin hybrid layers. *J Dent Res* 2011;90:1122-1128.

18. King NM, Tay FR, Pashley DH, Hashimoto M, Ito S, Brackett WW, Garcia-Godoy F, Sunico M. Conversion of one-step to two-step self-etch adhesives for improved efficacy and extended application. *Am J Dent* 2005;18(2):126-134.
19. Reis A, Leite TM, Matte K, Michels R, Amaral RC, Geraldeli S, Loguercio AD. Improving clinical retention of one-step self-etching adhesive systems with an additional hydrophobic adhesive layer. *JADA* 2009;140(7):877-885.
20. Sadek FT, Mazzoni A, Breschi L, Tay FR, Braga RR. Six-month evaluation of adhesives interface created by a hydrophobic adhesive to acid-etched ethanol-wet bonded dentine with simplified dehydration protocols. *J Dent* 2010;38:276-283.
21. Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjäderhane L, Pashley DH, Tay FR. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater* 2010;26:380-386.
22. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84(8):741-6.
23. Yoshihara K, Yoshida Y, Nagaoka N, Hayakawa S, Okihara T, De Munck J, Maruo Y, Nishigawa G, Minagi S, Osaka A, Van Meerbeek B. Adhesive interfacial interaction affected by different carbon-chain monomers. *Dent Mater*. 2013;29(8):888-97.
24. Toledano M, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater* 2013;29:e142–e152.
25. Osorio R, Cabello I, Toledano M. Bioactivity of zinc-doped dental adhesives. *J Dent* 2014;42:403-412.
26. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011;27(1):1-16.
27. Borges BC, Souza-Junior EJ, Brandt WC, Loguercio AD, Montes MA, Puppim-Rontani RM, Sinhoreti MA. Degree of conversion of simplified contemporary adhesive systems as influenced by extended air-activated or passive solvent volatilization modes. *Oper Dent* 2012;37(3):246-52.
28. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83(3):216-21.
29. Reis A, Cardoso PC, Vieira LC, Baratieri LN, Grande RH, Loguercio AD. Effect of prolonged application times on the durability of resin-dentin bonds. *Dent Mater* 2008;24(5):639-44.

30. Muñoz MA, Sezinando A, Luque-Martinez I, Szesz AL, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH, Perdigão J. Influence of a hydrophobic resin coating on the bonding efficacy of three universal adhesives. *J Dent* 2014;42(5):595-602.
31. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MRO, Hur YB, Garrett LV, Tay KCY. Bonding BisGMA to dentin – a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res* 2007;86(11):1034-1039.
32. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, Donnelly A, Garcia-Godoy F. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent* 2007;20(1):7-20.
33. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater* 2009;25:1050-1057.
34. Mortazavi V, Samimi P, Rafizadeh M, Kazemi S. A randomized clinical trial evaluating the success rate of ethanol wet bonding technique and two adhesives. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012;9(5):588-94.
35. Pappas M, Burns DR, Moon PC, Coffey JP. Influence of a 3-step tooth disinfection procedure on dentin bond strength. *J Prosthet Dent* 2005;93(6):545-50.
36. Simões DM, Basting RT, Amaral FL, Turssi CP, França FM. Influence of chlorhexidine and/or ethanol treatment on bond strength of an etch-and-rinse adhesive to dentin: An in vitro and in situ study. *Oper Dent* 2014;39(1):64-71.
37. Ekambaram M, Yiu CK, Matinlinna JP, King NM, Tay FR. Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bonds to sound and caries-affected dentine. *J Dent* 2014;42(6):709-19.
38. Feitosa VP, Pomacóndor-Hernández C, Ogliairi FA, Leal F, Correr AB, Sauro S. Chemical interaction of 10-MDP (methacryloyloxy-decyl-dihydrogen-phosphate) in zinc-doped self-etch adhesives. *J Dent* 2014;42(3):359-65.
39. Takahashi H. Effect of calcium salt of 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate produced on the bond durability of one-step self-etch adhesive. *Dent Mater J* 2014;33(3):394–401.
40. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Therapeutic effects of novel resin bonding systems containing bioactive glasses on mineral-depleted areas within the bonded-dentine interface. *J Mater Sci: Mater Med* 2012;23(6):1521-32.

41. Kim YK, Gu LS, Bryan TE, Kim JR, Chen L, Liu Y, Yoon JC, Breschi L, Pashley DH, Tay FR. Mineralisation of reconstituted collagen using polyvinylphosphonic acid/polyacrylic acid templating matrix protein analogues in the presence of calcium, phosphate and hydroxyl ions. *Biomaterials* 2010;31:6618-27.
42. Hashimoto M, Lijima M, Nagano F, Ohno H, Endo K. Effect of monomer composition on crystal growth by resin containing bioglass. *J Biomed Mat Res B: Appl Biomater* 2010; 94:(1)127-33.