

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DENTÍSTICA RESTAURADORA

RODRIGO STANISLAWCZUK GRANDE

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA CLOREXIDINA NA RESTISTÊNCIA DE UNIÃO DE
SISTEMAS ADESIVOS CONVENCIONAIS

PONTA GROSSA
2008

RODRIGO STANISLAWCZUK GRANDE

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA CLOREXIDINA NA RESTISTÊNCIA DE UNIÃO DE
SISTEMAS ADESIVOS CONVENCIONAIS

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Dentística Restauradora.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio.

PONTA GROSSA
2008

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

G751a Grande, Rodrigo Stanislawczuk
Avaliação da aplicação da clorexidina na resistência de
união de sistemas adesivos convencionais / Rodrigo
Sanislawczuk Gande. Ponta Grossa, 2007.
52 f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio

1. Adesivos dentários. 2. Resistência à tração . 3. Dentina. I.
Loguercio, Alessandro Dourado. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. III. T.

CDD: 617.67

RODRIGO STANISLAWCZUK GRANDE

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA CLOREXIDINA NA RESTISTÊNCIA DE UNIÃO DE
SISTEMAS ADESIVOS CONVENCIONAIS

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Dentística Restauradora.

Ponta Grossa, 04 de abril de 2008.



Prof. Dr. Alessandro Dourado Louguercio – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG



Prof. Dra. Josimeri Hebling
Faculdade de Odontologia de Araraquara -UNESP



Profª. Drª. Alessandra Reis
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

Dedico este trabalho:

Aos meus queridos pais Oswaldir e Regina, que mereceram reconhecimento especial em gratidão pelo apoio e encorajamento inabalável conduzindo-me em busca de meus ideais. Sem vocês nada seria possível.

Aos meus irmãos, Regeanne e Roberson, pelo incentivo quase incondicional e por estarem sempre presentes comigo.

A minha namorada Vanessa, também pelo incentivo e pela demonstração de imensa paciência.

Vocês são inspirações para tudo que há de nobre em minha vida. AMO VOCÊS.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio**, da Área de Dentística Restauradora, Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que de maneira insubstituível me orientou na realização deste trabalho, contribuindo para o meu crescimento científico e humano com sua sabedoria, amizade e dedicação. Mais que um excelente professor um grande e especial amigo. Obrigado por tudo.

A **Prof^a. Dr^a. Alessandra Reis**, da Área de Dentística Restauradora, Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela orientação e apoio durante a realização deste trabalho. Seu conhecimento amizade e dedicação foram de fundamental importância para minha formação.

A **Prof^a. Dr^a. Osnara Maria Mongruel Gomes**, Coordenadora Geral de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa e **Prof. Dr. João Carlos Gomes**, professores da disciplina de Dentística Restauradora por me iniciarem e sugerirem esta empreitada. Estimularam e confiaram em meu trabalho.

A vocês serei eternamente grato.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. João Carlos Gomes**.

Ao **Prof. Dr. Fábio André dos Santos**, Titular da Área de Periodontia, Departamento de Odontologia, pela competência e dedicação demonstrada durante o curso e pelas palavras de incentivo. Obrigado também pela amizade demonstrada diariamente.

A todos os **professores** do programa de Pós-Graduação e Graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Aos **funcionários** da Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade do Oeste de Santa Catarina pela amizade, atenção e alegria sempre dispostos a colaborar em todos os momentos.

Aos funcionários, técnico do laboratório do MEV, em especial **Dr. Milton**, ao estagiário e amigo **Diego Gadler**, a secretária do mestrado **Morgana** pela prontidão, boa vontade em ensinar e amizade consolidada ao longo dos meses.

Aos amigos do Curso de Mestrado, **Anas Paula, Gislaine, Eloísa, Prof. Emílio, Alfonso, Beatriz, Wilmer, Eugênio, Roberto, Sérgio, Shelon, Cristian, Michelli, Camila, Cristiana, Chigui e Manuela**, por todos os bons e maus momentos compartilhados e ajuda.

A todos os meus **amigos** que, ainda à distância, ou aqui esquecidos, me incentivaram continuar na busca dos meus ideais.

A **todos** que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Harmonize-se interiormente e sintonize as pessoas, de maneira simpática, ajudando com a bagatela de um sorriso como uma forma de uma dádiva espontânea.

Desde que você se imponha à tônica de instruir, amar, servir e passar adiante, sem a preocupação de colimar todos os objetivos, dando a cada um o direito de ser como é, em relação a própria conduta, busque ser HOJE melhor do que ontem e amanhã tente ser melhor do que hoje...”

(Divaldo Pereira Franco)

DADOS CURRICULARES

Rodrigo Stanislawczuk Grande

NASCIMENTO	15.12.1980 Ponta Grossa – Paraná
FILIAÇÃO	Rosalvo Grande e Regina Stanislawczuk
1999-2003	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa
2006-2008	Curso de Pós-Graduação em Odontologia Área de Concentração – Dentística Restauradora, Nível Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa - Paraná

Grande RS. Avaliação da aplicação da clorexidina na resistência de união de sistemas adesivos convencionais. [Dissertação de Mestrado]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa UEPG; 2008.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação da clorexidina em solução aquosa 2% ou presente no condicionador ácido na estabilidade de união à dentina de sistemas adesivos convencionais de dois passos através da análise da resistência de união e nanoinfiltração. Quarenta e dois molares humanos tiveram o esmalte e dentina superficial removidos para exposição de uma superfície plana. Nos grupos 1 e 2 (controle - C) os adesivos Prime&Bond NT (PB) e Adper Single Bond 2 (SB) foram aplicados após condicionamento ácido com ácido fosfórico convencional e reumedecimento com água. Nos grupos 3 e 4 (Ac/CHX) os mesmos adesivos foram aplicados de forma semelhante, porém empregou-se condicionador ácido contendo clorexidina. Nos grupos 5 e 6 (CHX), os adesivos foram aplicados de acordo com o grupo controle, porém o reumedecimento da dentina foi realizado com 2% de clorexidina durante 60s. Após aplicação do adesivo e fotoativação, um bloco de resina Opallis (FGM) foi confeccionado em três incrementos. As amostras foram submetidas a cortes seriados, gerando palitos com área de interface de união de aproximadamente 0,8mm². Metade dos corpos-de-prova (cp) foi dividida para ser testado imediatamente ou após 6 meses de armazenagem em água. Em cada tempo, os cps foram submetidos ao teste de microtração. Para análise do padrão de nanoinfiltração, 2 cps de cada dente foram selecionados, impregnados com nitrato de prata e polidos com lixas de SiC de granulação decrescente de lixas para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura. Os valores de RU foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas de dois fatores para cada adesivo e após teste de Tukey para contraste das médias ($\alpha=0,05$). As imagens de nanoinfiltração foram apenas observadas qualitativamente. Os resultados demonstraram que a interação dupla foi significativa para os dois sistemas adesivos ($p<0,05$). Tanto para o PB, como para o SB, os grupos controle apresentaram degradação da resistência de união após 6 meses de armazenamento em água. Quando ocorreu a aplicação da CHX em solução aquosa os valores de resistência de união foram mantidos após 6M, assim como quando foi aplicado o Ac/CHX. As imagens da nanoinfiltração confirmaram os resultados obtidos no teste de resistência de união, demonstrando maior quantidade de pigmentação por nitrato de prata na região da camada híbrida e camada de adesivo no grupo controle, em especial após 6M. Conclui-se que: o uso da CHX após o condicionamento ácido e o condicionamento ácido com CHX em sua formulação preservou a resistência de união à dentina e demonstraram um menor padrão de penetração de nitrato de prata quando comparados aos grupos em que a CHX não foi aplicada.

Palavras-chave: Adesivo. Clorexidina. Resistência de união. Dentina

Grande RS. Evaluation of chlorhexidine digluconate on the bond strength of etch-and-rinse adhesives. [Dissertation]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa UEPG; 2008.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of 2% chlorhexidine digluconate when in aqueous solution or associated to the conditioner on the resin-dentin bond strength (BS) of etch-and-rinse adhesives. Forty-two, caries free, extracted molars were included in this study. The occlusal enamel of all teeth was removed with a slow-speed diamond saw, under copious water-cooling, in order to expose a flat surface of dentin. In groups 1 and 2 (control – C), the surfaces were acid etched with conventional phosphoric acid and the adhesives Prime&Bond NT (PB) and Adper Single Bond 2 (SB) were applied after rinsing, drying and rewetting with water. In groups 3 and 4 (Ac/CHX) the same adhesives were applied in a similar manner, however a chlorhexidine containing acid was previously applied. In groups 5 and 6 (CHX) the adhesives were applied according to the control group; however the rewetting procedure was performed with an aqueous solution of 2% of CHX during 60s. Composite build-ups (Opallis, FGM) were constructed incrementally and specimens were longitudinally sectioned in the “x” and “y” directions to obtain bonded sticks (0.8 mm²) to be tested in tension at 0.5 mm/min immediately or after 6 months of water storage. For the nanoleakage investigation, 2 bonded sticks from each tooth were coated with nail varnish, placed in the silver nitrate and polished down with SiC paper. Resin-dentin interfaces were analyzed in a Scanning electron microscope. The BS data from each adhesive was submitted to a two-way repeated measures ANOVA and Tukey's test ($\alpha=0.05$). Both adhesives from the control groups showed reduction on the resin-dentin BS values after 6 months of water storage ($p<0.05$). When Ac/CHX or CHX was used, no reduction on the resin-dentin BS was observed. The nanoleakage pattern was more evident in the control than in the experimental groups. It was concluded that the use of CHX in an aqueous solution or associated with the conditioner was effective to reduce the degradation of resin dentin bonds after 6 months of water storage.

Keywords: Adhesive. Chlorhexidine. Bond-strength. Dentin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Adesivos Adper Single Bond 2 e Prime&Bond NT.....	24
Figura 2 - Desenho Experimental.....	24
Figura 3 - Fotos dos dentes intactos e com a oclusal desgastada.....	25
Figura 4 - Condicionamento ácido realizado; aplicação do adesivo e confecção dos incrementos de resina composta.....	28
Figura 5 - Condicionamento ácido a 37% e condicionamento ácido a 37% com clorexidina a 2% em sua formulação.....	29
Figura 6 - Resina Composta Opallis (FGM, Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil).....	29
Figura 7 - Solução de digluconato de clorexidina 2% da FGM.....	30
Figura 8 - Fotoativação dos incrementos de resina composta com aparelho VIP.....	30
Figura 9 - Corpo-de-prova fixado no anel que se acopla à máquina de corte.....	31
Figura 10 - Corpo-de-prova cortado longitudinal e transversalmente.....	32
Figura 11 - Corpo-de-prova colado à garra para realização de microtração.....	33
Figura 12 - Fotomicrografia da interface de união dentina (DE) e resina composta (RC) para o adesivo Adper Single Bond 2 (1200X). Observe na seta referente ao código NP a presença de nitrato de prata (NP). AD = Adesivo; CH = Camada híbrida.....	39
Figura 13 – Fotomicrografia dos grupos experimentais no tempo imediato com um aumento de 700X.....	40
Figura 14 - Fotomicrografia dos grupos experimentais no tempo imediato com um aumento de 1200X.....	41
Figura 15 - Fotomicrografias dos grupos experimentais após 6 meses de armazenagem em água. Em A) PB Controle; B) PB CHX 2%; C) PB Ac CHX 2%; D) SB Controle; E) SB CHX 2% e F) SB Ac CHX 2% no aumento de 700X no tempo de 6 meses.....	42
Figura 16 - Fotomicrografias dos grupos experimentais após 6 meses de armazenagem em água. Em A) PB Controle; B) PB CHX 2%; C) PB Ac CHX 2%; D) SB	

Controle; E) SB CHX 2% e F) SB Ac CHX 2% no aumento de 1200X no tempo de meses.....	43
Tabela 1 – Sistemas adesivos e seqüência de aplicação.....	26
Tabela 2 – Média e desvio-padrão (mm ²) da AST de cada grupo de estudo, em função de todas as condições experimentais	35
Tabela 3 – Distribuição do modo de fratura e perda prematura dos corpos-de-prova (%) dos Adesivos Prime&Bond NT e Adper Single Bond 2 de acordo com a condição experimental.....	36
Tabela 4 - Médias e desvio-padrão, bem como análise estatística, da resistência de união por microtração (MPa) no tempo imediato e após 6 meses de estocagem em água para cada uma das condições experimentais.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3	PROPOSIÇÃO.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	SISTEMAS ADESIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
4.2	SELEÇÃO E PREPARO DOS DENTES.....	25
4.3	PROCEDIMENTO ADESIVO.....	27
4.4	PROCEDIMENTO RESTAURADOR.....	28
4.5	PREPARO DOS CORPOS-DE-PROVA.....	31
4.6	ENSAIO DE MICROTRAÇÃO DOS CORPOS-DE-PROVA.....	32
4.7	ANÁLISE DA ULTRAMORFOLOGIA POR MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA.....	33
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5	RESULTADOS.....	35
6	DISCUSSÃO.....	44
7	CONCLUSÃO.....	50
8	REFERÊNCIAS.....	51

ANEXOS A - Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da
Universidade Estadual de Ponta Grossa COEP – UEPG

1 INTRODUÇÃO

O aprimoramento dos materiais poliméricos para uso odontológico tem permitido importantes avanços na técnica restauradora, viabilizando procedimentos mais conservadores e estéticos. A união dos materiais restauradores à estrutura dental é medida e intermediada pelo sistema adesivo. O mecanismo básico de adesão do esmalte e da dentina é determinado pela remoção do componente inorgânico e substituição do tecido dental duro pelos monômeros resinosos que se conectam micro-mecanicamente as porosidades previamente criadas por ácidos (Van Meerbeeck *et al.*¹ 2003).

Diversos são os problemas para se conseguir adesão dos materiais restauradores com as estruturas dentais. A heterogeneidade dos substratos dentários, com conteúdo inorgânico e orgânico, e o teor de umidade são as principais dificuldades para alcançar uma adesão durável em dentina e esmalte. O desempenho clínico dos sistemas adesivos atuais disponíveis no mercado difere diante do substrato no qual são aplicados. O esmalte é considerado um substrato com maior conteúdo mineral e de morfologia homogênea, em contrapartida a dentina corresponde a um tecido com menor conteúdo mineral, de natureza heterogênea e intrinsecamente úmido.

A água desempenha importante papel na obtenção da adesão. Estabelece situações que determinam os mecanismos de degradação da interface adesiva e também a redução das propriedades mecânicas dos sistemas adesivos (Carrilho *et al.*² 2004). Na formação da camada híbrida, há evidências de que a zona de dentina desmineralizada não é completamente infiltrada pelo agente adesivo (Wang

& Spencer.³ 2002) isto permite que as fibrilas de colágeno expostas pela desmineralização fiquem desprotegidas da ação dos fluídos orais. A existência dessas fibrilas desprotegidas compromete a longevidade da restauração. Esse fenômeno levantou a hipótese de que a perda de resistência de união à dentina observada a longo prazo era decorrente da degradação das fibrilas e colágeno expostas e desprotegidas (Burrow *et al.*⁴ 1993).

Estudo in vivo e in vitro reportou que a interface resina/dentina degradada, em particular, quando exposta a fluídos orais ou à água por períodos de tempos que variam de meses a anos (Shirai *et al.*⁵ 2005). Outro estudo laboratorial mostrou que o armazenamento ao longo do tempo em água aumentou o número de falhas nas interfaces adesivas (De Munck *et al.*⁶ 2004).

Um dos fatores intrínsecos relacionados à degradação da interface de união está relacionada a enzimas hospedeiras da saliva humana conhecidas como metaloproteinases (MMPs). Essas enzimas são inativadas pelo condicionamento ácido, e têm papel fundamental na degradação da matriz de colágeno quando ocorre incompleta penetração do *primer* adesivo nas fibrilas colágenas desnudas pelo condicionamento ácido (Pashley *et al.*,⁷ 2004).

A clorexidina tem sido amplamente utilizada como agente antimicrobiano de desinfecção antes da realização das restaurações. Porém, quando aplicada após o condicionamento ácido não tem efeito adverso na imediata composição da interface de união da dentina (Perdigão *et al.*⁸ 1994) e do esmalte (Filler *et al.*⁹ 1994). Estudos de longevidade mostram que a clorexidina age como inibidor dessas metaloproteinases desacelerando assim o processo de degradação dessa interface (Carrilho *et al.*¹⁰

2007). A clorexidina mostra-se efetiva em concentrações extremamente baixas em 0,02% e 0,002% (Gendron *et al.*¹¹ 1999) mas porém, ainda não se sabe em qual concentração ela é mais eficaz e também, quanto tempo faz-se necessário tal aplicação.

Assim se faz oportuno conduzir um estudo que demonstre se a aplicação da clorexidina a 2% previamente ao condicionamento ácido ou a sua presença no condicionamento propriamente dito protege as fibrilas de colágeno desnudas e inibe as MMPs, conseqüentemente gerando uma menor degradação da interface de união e maior tempo de vida útil às restaurações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O sucesso imediato das restaurações dentárias estéticas pode ser verificado pela aparência correta de cor, forma, brilho e lisura de superfície das mesmas, porém para que possam ser consideradas restaurações “permanentes”, deve apresentar um comportamento clínico aceitável imediato e a longo prazo. Para que este comportamento possa ser alcançado, faz-se necessária a obtenção e manutenção de uma adequada união da restauração à estrutura dental.

Os procedimentos adesivos no esmalte são considerados muito efetivos (Swfit *et al.*¹² 1995; Lopes *et al.*¹³ 2002) já a adesão ao substrato dentinário é muito complexa, constituindo-se em um grande desafio, associado às características intrínsecas e morfológicas da dentina, além da presença da *smear layer* (Pashley *et al.*¹⁴ 1997).

Os sistemas adesivos sofreram ao longo do tempo diversas modificações e diferentes classificações. Atualmente estes sistemas adesivos podem ser divididos em convencionais e autocondicionantes. Adesivos convencionais são aqueles que empregam o passo operatório do condicionamento ácido da superfície de esmalte e dentina separadamente dos outros passos. Ainda, eles podem ser subdivididos de acordo com o número de passos para a sua aplicação em: convencionais de três passos, que apresenta ácido + *primer* + adesivo em etapas separadas e convencionais de dois passos que apresentam ácido + adesivo, onde o *primer* está junto com o adesivo em um único frasco. Nesses sistemas, geralmente emprega-se o

ácido fosfórico para produzir no substrato dentário as microporosidades necessárias para a posterior infiltração dos monômeros resinosos (Carvalho *et al.* ¹⁵ 2004).

Os sistemas adesivos autocondicionantes diferem dos convencionais especificamente por não necessitarem da aplicação isolada de um ácido para produzir porosidades no substrato. Esses adesivos incorporam em sua formulação, monômeros resinosos ácidos, que simultaneamente desmineralizam e infiltram-se nos tecidos dentais. Como os próprios monômeros criam sua via de infiltração, estes não devem ser lavados da superfície após a aplicação. Os adesivos autocondicionantes dividem-se em: autocondicionantes de dois passos, nos quais um frasco é composto do *primer* que é a solução acidificada e o outro frasco é o adesivo propriamente dito e adesivos autocondicionantes de um passo ou passo único. Os fabricantes uniram o *primer* ácido com a resina adesiva, dessa maneira, uma única solução, contém os monômeros ácidos, solventes, diluentes e água. O adesivo é aplicado diretamente sobre o substrato dental não condicionado e desempenha a função de desmineralização, infiltração e posterior ligação com o material restaurador (Carvalho *et al.* ¹⁵ 2004).

Quando adesivos autocondicionantes são usados, há menos risco de ocorrer incompleta infiltração dentina/monômeros resinosos. Isso porque a desmineralização ocorre simultaneamente à aplicação do adesivo (Nakabayashi *et al.* ¹⁶ 1998). Porém, existem estudos demonstrando a existência de zonas de dentina desmineralizada com deficiente infiltração dos monômeros (Tay *et al.* ¹⁷ 2002). Os adesivos dentinários são compostos pelo *primer*, sendo este um componente mais fluido e hidrofílico, cuja função primordial é penetrar nas porosidades úmidas da dentina desmineralizada e

pelo adesivo, uma resina fluida hidrófoba, que recobre o *primer* e o une com o material restaurador (Garone Filho ¹⁸ 2002).

Os *primers* são monômeros dissolvidos em um solvente, que podem ser do tipo acetona, álcool ou água. Os monômeros hidrofílicos são moléculas bifuncionais com características hidrofílicas e hidrofóbicas. Sua afinidade pela água, pela terminação hidrofílica permite a penetração no substrato dentinário úmido, e a outra terminação garante a polimerização por meio do rompimento da dupla ligação de carbono com a camada de adesivo (Garone Filho ¹⁸ 2002).

As resinas fluidas ou adesivo propriamente dito são monômeros hidrófobos como o Bis-GMA, podendo ter em menor quantidade, monômeros hidrofílicos, e servirão de intermediário entre o *primer* e a resina composta (Garrone Filho ¹⁸ 2002).

A água presente nos espaços interfibrilares, maximiza a expansão das fibrilas colágenas e mantém os espaços necessários para a infiltração dos monômeros. A dentina desmineralizada pode ser re-hidratada com diferentes quantidades de água, dependendo da composição do solvente. Os sistemas a base de acetona não conseguem re-expandir a rede de colágeno, necessitando então de uma aplicação vigorosa (Dal Bianco *et al.* ¹⁹ 2005). e um substrato mais úmido. Já, os sistemas adesivos a base de água/álcool não devem ser aplicados a superfícies úmidas uma vez que não são capazes de deslocar água rapidamente como a acetona. A acetona presente nos adesivos tem uma maior pressão de vapor que a água/etanol o que requer menos tempo para sua completa evaporação

Retirando-se o solvente do adesivo compromete-se severamente a estrutura e a integridade da camada híbrida (Miyazaki *et al.* ²⁰ 1996). Aumentando a concentração

de acetona em adesivos de frasco único diminui-se a resistência de união com manifestações morfológicas de rachaduras e fendas ao longo da interface adesiva (Cho *et al.* ²¹ 2004). A presença de água remanescente pode interferir na polimerização do sistema adesivo deixando os monômeros residuais mais susceptíveis a lixiviação dessas regiões em particular (Hashimoto *et al.* ²² 2004).

Uma pequena incorporação de 9% de água na formulação do adesivo tem sido considerada prejudicial às propriedades mecânicas como a resistência de união. A separação de fase do adesivo pode resultar em muita porosidade dentro camada híbrida a qual se caracteriza pelas partículas hidrofóbicas ricas em Bis-GMA distribuídas na matriz hidrofílica rica em HEMA (Wang *et al.* ²³ 1998).

Devido a esta fase, monômeros resinosos de Bis-GMA, da parte hidrofóbica, não penetram totalmente na dentina desmineralizada (Miyazaki *et al.* ²⁴ 2002) deixando fibrilas colágenas desprotegidas e potencialmente instáveis sendo propensa à hidrólise (Hashimoto *et al.* ²² 2004) ou degradação enzimática (Pashley *et al.* ²⁵ 2004) por fluídos orais. A sorção de água, na fase hidrofílica dos adesivos, pode diminuir a resistência de união dos adesivos e comprometer a longo prazo a união resina/dentina (Carrilho *et al.* ²⁶ 2005).

Estudos recentes revelaram que a adesão dentina/resina dos sistemas adesivos hidrofílicos pode degradar severamente com o passar do tempo (Sano *et al.* ²⁷ 1999). As razões para a incompleta infiltração dos monômeros resinosos na rede de colágeno são inúmeras (hidrofilia, peso molecular, ausência de vias de difusão etc). O resultado final é uma camada híbrida porosa (Wang *et al.* ²⁸ 2003) e mais suscetível à degradação por fluídos orais (Sano *et al.* ²⁷ 1999; Tay *et al.* ¹⁷ 2002). Idealmente

procedimentos adesivos deveriam ser realizados na ausência de água empregando resinas hidrofóbicas as quais são mais estáveis com o passar do tempo.

A literatura sugere que enzimas proteolíticas presentes na saliva e na matriz extracelular de dentina desmineralizada tem um importante papel na degradação do colágeno exposto pelo condicionamento ácido e nas lesões de cáries (Van Strijp *et al.*²⁹ 2003; Tjaderhane *et al.*³⁰ 2002). Essas endopeptidases são chamadas de metaloproteinases da matriz (MMPs), e são capazes de degradar proteínas da matriz extracelular incluindo formas de colágeno nativa e desnaturada (Tjaderhane *et al.*³⁰ 2002). MMPs são uma classe de endopeptidases dependentes de zinco e cálcio (Visse *et al.*³¹ 2003) que se encontram presas dentro da matriz dentinária mineralizada durante o desenvolvimento dental (Van Strijp *et al.*²⁹ 2003).

A clorexidina é um agente antibacteriano que possui propriedades inibidoras de MMPs (Gendron *et al.*¹¹ 1999). Possui íons positivos os quais ligam-se aos grupos fosfato. A substância química foi introduzida há muitos anos como anti-séptico de largo espectro contra bactérias gram-positivas e negativas (Davies *et al.*³² 1954). Ela é uma biguanida com propriedades catiônicas e sua nomenclatura química é digluconato de clorexidina. Esta é uma molécula estável, que quando ingerida é excretada pelas vias normais, sendo que em pequena porcentagem que fica retida no organismo não é tóxica. Quando em baixas concentrações, provoca lixiviação de substâncias de pequeno peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo efeito bacteriostático e bactericida em altas concentrações (Silva *et al.*³³ 2002).

O condicionamento ácido aumenta a energia de superfície do esmalte e talvez da dentina (Perdigão *et al.*⁸ 1994;) nos conduzindo à aplicação da clorexidina após o

condicionamento ácido, assim, melhorando a habilidade dos *primers* resinosos infiltrar na rede de matriz dentinária úmida. Quando a clorexidina é aplicada após do condicionamento ácido o resultado é a preservação da integridade do colágeno dentro da camada híbrida *in vivo* (Mazzoni *et al.* ³⁴ 2006; King *et al.* ³⁵ 2005) confirmando o envolvimento indireto das MMPs no processo de degradação colágeno. Entretanto uma causa e efeito relacionando os adesivos convencionais e a degradação da interface de adesão ainda não está estabelecida. Presume-se que a desmineralização ocasionada pelo condicionamento ácido inativa as MMPs liberando-as de dentro da matriz dentinária mineralizada (Pashley *et al.* ²⁵ 2004) resultando em uma atividade collagenolítica e gelatinolítica (Breschi *et al.* ³⁶ 2007).

No mesmo sentido, outro agente antimicrobiano o MDPB (12 metacriloiloxidodecylpiridinium bromido) desempenha papel semelhante a clorexidina na resistência de união. A incorporação de MDPB aumenta a hidrofília do adesivo e pode resultar em uma melhor estabilidade da interface adesiva (Imazato *et al.* ³⁷ 2006).

3 PROPOSIÇÃO

1. Avaliar se a aplicação do digluconato de clorexidina a 2% afeta a resistência de união e nanoinfiltração da interface de união de dois sistemas adesivos convencionais de dois passos a dentina, no tempo imediato e após 6 meses e avaliar se o condicionamento ácido com digluconato de clorexidina a 2% em sua formulação afeta a resistência de união e nanoinfiltração da interface de união de dois sistemas adesivos convencionais de dois passos a dentina, no tempo imediato e após 6 meses.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SISTEMAS ADESIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram selecionados para este estudo dois sistemas adesivos sendo eles: Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St Paul, MN, EUA) com solvente a base de água e etanol e Prime&Bond NT (PB Caulk-Dentsply) com solvente a base de acetona (Figura 1). Os dois sistemas adesivos selecionados para o estudo são convencionais de dois passos, ou seja, preconizam a técnica de condicionamento ácido previ com ácido fosfórico e apresentam em um único frasco. O estudo é composto de 6 condições experimentais, de acordo com a combinação dos fatores: Tratamento (3 níveis) conforme especificado na tabela 1 e; Tempos (2 níveis) (Figura 2). A composição e o modo de aplicação estão descritos na tabela 1. O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob o número de parecer 14/2007 e protocolo número 6280/06. (Anexo A).



Figura 1 – Adesivos Adper Single Bond 2 e Prime&Bond NT.

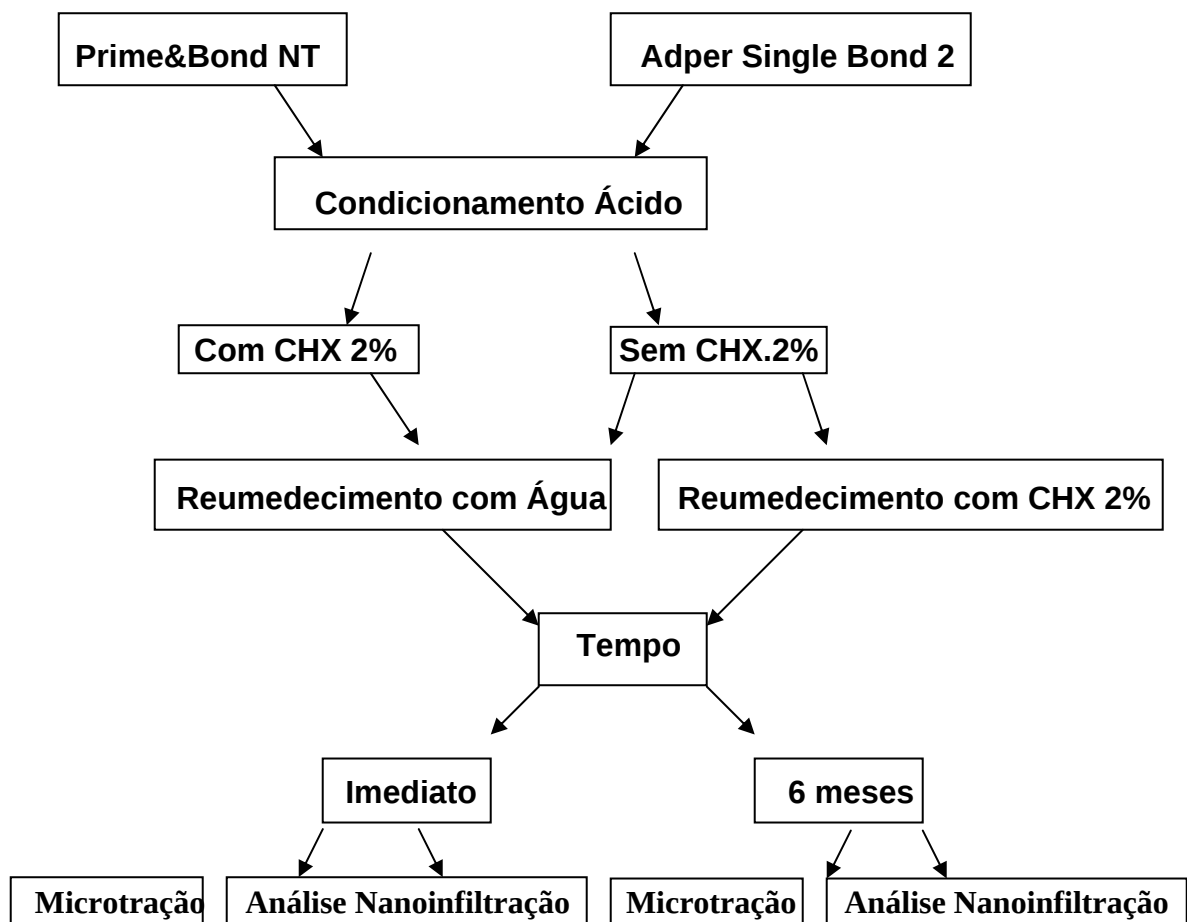


Figura 2 – Desenho Experimental.

4.2 SELEÇÃO E PREPARO DOS DENTES

Foram utilizados 42 terceiros molares humanos, hígidos, extraídos por indicação odontológica, armazenados em solução de cloramina a 0,5% por 24 horas e posteriormente em água destilada (De Wald ³⁸ 1997). O esmalte da superfície oclusal dos dentes foi desgastado com lixa de carbeto de silício (granulação 180) sob irrigação, até ser obtida uma superfície dentinária sem remanescentes de esmalte. Para obter uma *smear layer* padronizada, as superfícies foram tratadas com lixas de carbeto de silício (granulação 600) por 60 segundos. Os dentes foram divididos em 3 condições experimentais por adesivo, perfazendo um total de 7 dentes para cada condição experimental sendo 5 dentes para análise por microtração e 2 dentes submetidos ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de maneira semelhante ao trabalho realizado por Reis ³⁹ *et al.* (2006).



Figura 3 – Fotos dos dentes intactos e com a oclusal desgastada.

Tabela 1 – Sistemas Adesivos e Sequência de Aplicação

Sistema Adesivo	Grupos	Composição	Modo de Aplicação (*)	Característica do Grupo
Prime&Bond NT	PB controle	1. Resina de Di e Trimetacrilato; Sílica Coloidal nanométrica silanizada; PENTA; Fotoiniciantes; Estabilizantes; Hidrofluoreto de cetilamina e Acetona.	a1, b, c, d3, e, f, g.	Controle
	PB CHX 2%		a1, b, c, d4, e, f, g.	Reumedecimento por 60 s com clorexidina 2%
	Ác.CHX 2% PB		a2, b, c, d3, e, f, g.	Condicionamento ácido com clorexidina 2%
Adper Single Bond 2	SB controle	1. Etanol; Bis-GMA; silano tratado com filler de sílica; 2-hidroxietilmetacrilato; glicerol 1; 3 dimetacrilato; copolímero de ácido acrílico e ácido itocônico e diuretano dimetacrilato; água	a1, b, c, d1, e, f, g.	Controle
	SB CHX 2%		a1, b, c, d2, e, f, g.	Reumedecimento por 60 s com clorexidina 2%
	Ác.CHX 2% SB		a2, b, c, d1, e, f, g.	Condicionamento ácido com clorexidina 2%

(*) Modo de aplicação: **a1**: condicionamento ácido convencional a 37% (15 s); **a2**: condicionamento ácido a 37% com clorexidina 2% (15 s); **b**: lavagem com spray ar e água (15 s); **c**: secagem com ar (30 s); **d1**: dentina reumedecida com 1,5µL de água; **d2**: dentina reumedecida com 1,5µL de clorexidina a 2% por 60 s; **d3**: dentina reumedecida com 3,5µL de água; **d4**: dentina reumedecida com 3,5µL de clorexidina a 2% por 60 s; **e**: duas camadas de sistema adesivo, aplicado *brush* por 10 s cada; **f**: cada camada foi seca por 30 s de ar a 20 cm; **g**: fotoativação (10 s, 600mW/cm²).

4.3 PROCEDIMENTO ADESIVO

Os materiais foram aplicados de acordo com a indicação descrita na Tabela 1, ou seja, aplicação dos materiais de forma convencional, reumidecimento após condicionamento ácido com clorexidina 2% ou o condicionamento realizado com um ácido com clorexidina a 2% em sua composição. A seguir, descreve-se detalhadamente a seqüência de aplicação de cada grupo:

1. ácido fosfórico a 37% sem clorexidina por 15s; lavagem com spray ar-água por 15s; secagem com ar por 30s; reumidecimento com água destilada 3,5 μ L (Reis *et al.*⁴⁰ 2003) utilizando uma micropipeta (Pipetman, Gilson, NY, EUA); aplicação de 2 camadas com *brush* do Adesivo Prime&Bond NT por 10s com evaporação do solvente por jato de ar de cada camada por 30s a uma distância média de 20 cm; fotoativação de cada camada por 10s com um aparelho VIP (Bisco, Schaumburg, IL, EUA) calibrado em 600mW/cm²;
2. idêntico ao anterior, apenas com diferença no reumidecimento com clorexidina 3,5 μ L (Reis *et al.*⁴⁰ 2003);
3. idêntico ao primeiro, apenas com diferença no condicionamento ácido com clorexidina a 2% por 15s;
4. ácido fosfórico a 37% sem clorexidina por 15s; lavagem com spray ar-água por 15s; secagem com ar por 30s; reumidecimento com água destilada 1,5 μ L (Reis *et al.*⁴⁰ 2003) utilizando uma micropipeta (Pipetman, Gilson, NY, EUA); aplicação de 2 camadas com *brush* do Adesivo Adper Single Bond 2 por 10s

com evaporação do solvente por jato de ar de cada camada por 30s a uma distância média de 20 cm; fotoativação de cada camada por 10s com um aparelho VIP (Bisco, Schaumburg, IL, EUA) calibrado em 600mW/cm²;

5. idêntico ao anterior, apenas com diferença no reumidecimento com clorexidina 2%, 1,5μL (Reis *et al.*⁴⁰ 2003);
6. Idêntico ao 4, apenas com diferença no condicionamento ácido com clorexidina a 2% por 15s.

4.4 PROCEDIMENTO RESTAURADOR

Após o procedimento adesivo, foram confeccionadas restaurações de resina composta Opallis (FGM, Prod Odont Ltda, Joinvile, SC, Brasil) com 3,0 mm de altura, em três porções. Cada uma das porções foi fotoativada por 40 s com potência média de 600mW/cm² (aparelho VIP). Na sequência, os dentes foram armazenados em água destilada a 37°C por 24 horas. Todos os procedimentos restauradores foram realizados por um único operador a uma temperatura ambiente de 24°C e uma umidade relativa do ar de 75% (Asmussen *et al.*,⁴¹ 2001).



Figura 4 – Condicionamento ácido realizado; aplicação do adesivo e confecção dos incrementos de resina composta

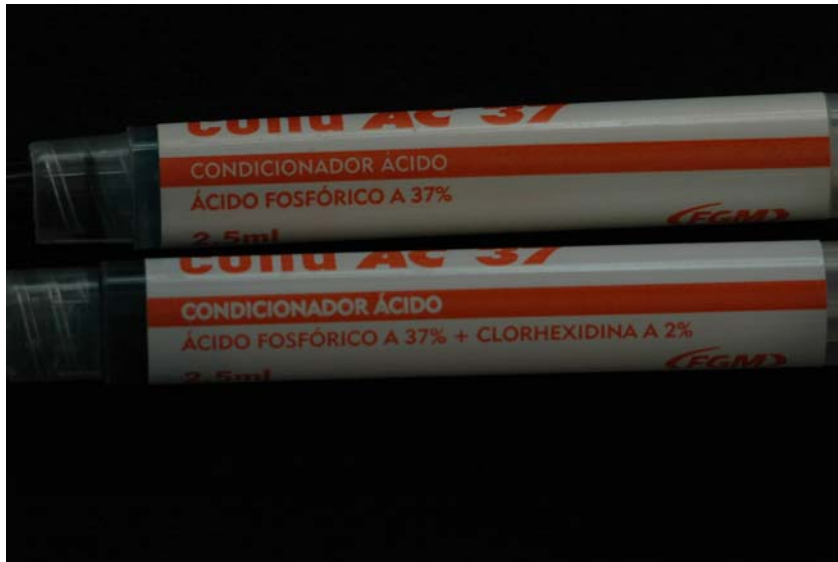


Figura 5 – Condicionamento ácido a 37% e condicionamento ácido a 37% com clorexidina a 2% em sua formulação.



Figura 6 – Resina Composta Opallis (FGM, Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil).



Figura 7 – Solução de digluconato de clorexidina 2% da FGM.

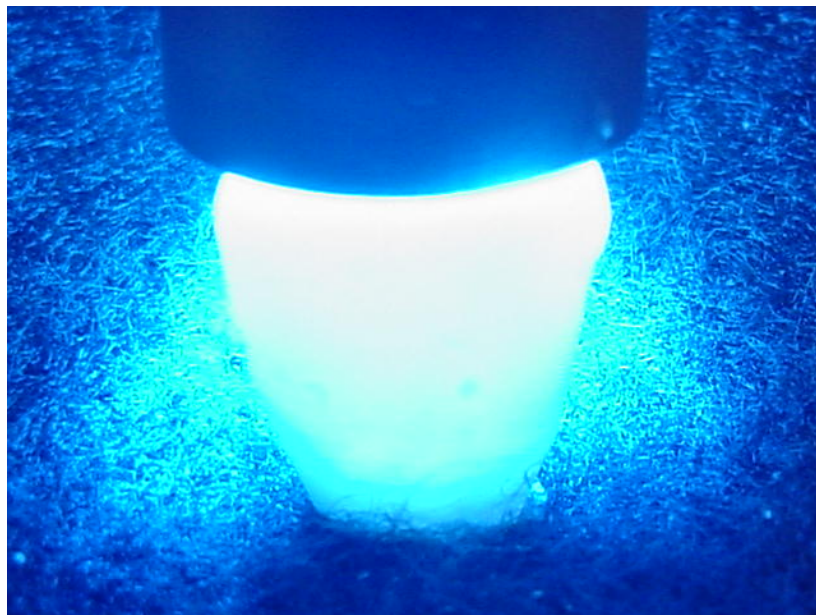


Figura 8 – Fotoativação dos incrementos de resina composta com aparelho VIP – Bisco.

4.5 PREPARO DOS CORPOS-DE-PROVA (cps)

Após restaurados, os dentes foram fixados com godiva de baixa fusão a um dispositivo a ser fixado em uma máquina de corte de tecidos duros Labcut 1010 (Extec Corp., Enfield, CT, EUA) com a interface de união perpendicular ao disco de corte. Foram realizadas duas seqüências de cortes longitudinais e perpendiculares entre si para obtenção de espécimes com área de secção transversal de aproximadamente 0,8 mm². O remanescente de dentina foi mensurado nos cps provenientes do teto da câmara pulpar para verificar a profundidade em dentina. Em cada dente, metade dos cps foi testado no tempo imediato (após 24 horas) ou 6 meses. A armazenagem foi realizada em água destilada a 37°C.



Figura 9 – Corpo-de-prova fixado no anel que se acopla à máquina de corte.

4.6 ENSAIO DE MICROTRAÇÃO

Cada cp foi fixado com cola de cianocrilato (Zapit, Dental Ventures of North América, Carona, CA, EUA) a uma garra desenvolvida para os ensaios de microtração que foi acoplada à máquina de ensaios (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brazil), onde as tensões de tração ocorriam perpendiculares à interface de colagem. A máquina foi operada a uma velocidade de 0,5 mm/min. Para o cálculo da tensão de ruptura de cada cp, o qual foi obtido em MPa, a área da seção transversal dos corpos-de-prova foi mensurada com o auxílio de um paquímetro digital (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tóquio, Japão) e convertida em mm². A análise dos corpos de prova fraturados foi realizada em estereomicroscópio 40X (Zeis) e classificada nos seguintes padrões: 1) coesiva de dentina; 2) coesiva de resina composta; 3) adesiva/mista na interface.



Figura 10 – Corpo-de-prova cortado longitudinal e transversalmente.



Figura 11 - Corpo-de-prova colado ao dispositivo para realização de microtração.

4.7 ANÁLISE DO PADRÃO DE NANOINFILTRAÇÃO POR MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

Os cps foram revestidos por 2 camadas de verniz aplicados ao redor da interface de união. Então, foram re-hidratados com água destilada por 10 minutos antes da imersão em solução traçadora por 24 horas. O nitrato de prata foi preparado de acordo com o protocolo proposto por Tay et al.,⁴². Os cps foram armazenados em local escuro por 24 horas, após, estes foram lavados e imersos em solução foto-reveladora por mais 8 horas sob luz fluorescente. Todos os cps foram polidos com lixa de carbeto de silício de granulação 600 para remoção do verniz. Os cps foram colocados dentro de um anel de acrílico, presos os dois lados por fita adesiva e embebidos de resina epóxica. Os palitos foram então, reduzidos por desgaste até a metade de espessura com lixas de carbeto de silício em lixas de granulação decrescente sob irrigação constante. Os cps foram então, dissecados com sílica e

posteriormente metalizados. A interface dentina/resina foi então analisada qualitativamente em Microscopia Eletrônica de Varredura (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK), a fim de verificar a nanoinfiltração de nitrato de prata na região da camada híbrida.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de resistência de união de cada adesivo foram tabulados e submetidos a uma análise de variância de medidas repetidas de 2 fatores (Tratamento e Tempo), sendo o fator Tempo a medida repetida ($\alpha=0,05$). Para o contraste das médias foi utilizado o teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Para a análise da ultra-morfologia através de MEV e deposição de nitrato de prata foram feitas apenas análises qualitativas.

5 RESULTADOS

Aproximadamente 18 a 20 palitos foram obtidos por dente restaurado, incluindo aqueles perdidos prematuramente. A área de secção transversal (AST) medida dos cps variou entre 0,83 a 0,88mm². Para cada grupo de estudo calculou-se o valor médio da área de secção transversal dos cps testados, e valores de média e desvios-padrões estão representados na tabela 1. Apenas pela análise descritiva pode-se observar a homogeneidade dos valores médios da AST entre os diferentes grupos de estudo, condição considerada necessária para a análise comparativa dos valores de resistência de união dos mesmos grupos (Pashley *et al.*¹⁴ 1997).

Tabela 2 – Médias e desvio padrão (mm²) da AST de cada grupo de estudo, em função de todas as condições experimentais (*).

Grupos	imediate	6 meses
<i>PB controle</i>	0,83 ± 0,05	0,85 ± 0,04
<i>PB CHX 2%</i>	0,84 ± 0,04	0,85 ± 0,06
<i>Ác.CHX 2% PB</i>	0,83 ± 0,06	0,83 ± 0,06
<i>SB controle</i>	0,88 ± 0,06	0,86 ± 0,04
<i>SB CHX 2%</i>	0,87 ± 0,02	0,84 ± 0,06
<i>Ac. CHX 2% SB</i>	0,85 ± 0,05	0,87 ± 0,07

(*) As médias de área aqui apresentadas foram feitas previamente a divisão dos palitos de acordo com o fator tempo

A porcentagem de cps com fratura prematura e a frequência de fratura em cada um dos grupos experimentais estão expostas na tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição do modo de fratura e perda prematura dos corpos-de-prova (%) dos Adesivos Prime&Bond NT e Adper Single Bond 2 de acordo com a condições experimentais.

Condição experimental	Imediato					
	Prime&Bond NT			Adper Single Bond 2		
	Padrão de fratura	A/M (%)	C (%)	Perdidos (%)	A/M (%)	C (%)
Controle	30 (67%)	0/0 (%)	10 (33%)	38 (85%)	2 (5%)	4 (10%)
Reumidecimento com CHX	39 (75%)	1 (2,5%)	9 (22,5%)	52 (96,3%)	0/0 (%)	2 (4,8%)
Ácido com CHX	58 (83%)	0/0 (%)	9 (17%)	58 (87,6%)	2 (3,4%)	6 (10%)

Condição experimental	6 meses					
	Prime&Bond NT			Adper Single Bond 2		
	Padrão de fratura	A/M (%)	C (%)	Perdidos (%)	A/M (%)	C (%)
Controle	22 (75,8%)	1 (4,5%)	6 (20,6%)	27 (64,3%)	0/0 (%)	15 (35,7%)
Reumidecimento com CHX	18 (94,4%)	0/0 (%)	1 (5,6%)	20 (100%)	0/0 (%)	0/0 (%)
Ácido com CHX	29 (72,4%)	0/0 (%)	8 (27,6%)	30 (76,9%)	0/0 (%)	9 (23,1%)

A/M – modo de fratura adesiva ou mistae; C –modo de fratura coesiva

Tanto no tempo imediato como ao longo do tempo, os resultados indicam que a distribuição do padrão de fratura foi variável entre os grupos, sendo que houve uma predominância de falha tipo adesivo/misto (A/M) independente do sistema adesivo utilizado, tipo de condicionamento e reumedecimento. A maior frequência de corpos-de-prova fraturados no tempo imediato foi observada no adesivo PB, que foi cerca de 17% de fraturas prematuras.

Já ao longo do tempo, a maior frequência de cps fraturados foi novamente para o adesivo PB. Contudo não houve um aumento em relação ao tempo imediato. Já para o adesivo SB houve um aumento do número de palitos perdidos após 6 meses em relação ao tempo imediato. Vale salientar que, após 6 meses de armazenagem em água, o grupo em que ocorreu o reumedecimento com clorexidina a 2% não apresentou palitos perdidos para os dois sistemas adesivos. Já para os outros grupos, houve cerca de 20% de perdas após a armazenagem em água.

As médias de resistência de união e desvios-padrão (em MPa) obtidos para os sistemas adesivos Prime&Bond NT e Adper Single Bond 2, em todas as condições experimentais avaliadas, estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 – Médias e desvios padrões, bem como análise estatística, da resistência de união por microtracção (MPa) no tempo imediato e após 6 meses de estocagem em água para cada uma das condições experimentais (*)

Adesivo	Prime&Bond NT		Adper Single Bond 2	
Tratamento/Tempo	Imediato	6 meses	Imediato	6 meses
Controle	22,27 ± 9,7 B	14,62 ± 4,5 C	27,88 ± 12,2 a	20,48 ± 2,4 b
Reumidecimento com CHX 2%	21,19 ± 4,7 B	23,41 ± 1,3 B	30,88 ± 3,1 a	31 ± 2,8 a
Ácido com CHX 2%	30,61 ± 9,0 A	25,66 ± 2,8 A,B	30,15 ± 4,4 a	29,15 ± 6,8 a

(*) Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam significância estatística para cada um dos sistemas adesivos

A análise de variância de dois fatores para o adesivo Prime&Bond NT mostrou que, a dupla interação foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$), assim como o fator tempo ($p = 0,03$). O tempo de 6 meses apresentou uma menor média de resistência de união, mas esta diferença apenas foi significativa para o grupo controle.

A análise de variância de dois fatores para o adesivo Adper Single Bond 2 mostrou também que apenas a dupla interação foi estatisticamente significativa ($p = 0,01$). Assim como para o adesivo Prime&Bond NT, o tempo de 6 meses apresentou uma menor média de resistência de união, mas esta diferença apenas foi significativa para o grupo controle.

As fotomicrografias ilustradas da interface de união entre dentina e resina composta para o adesivo PB e o adesivo SB a seguir representam a camada de adesivo formada; túbulos dentinários e parte da resina composta (Figura 12).

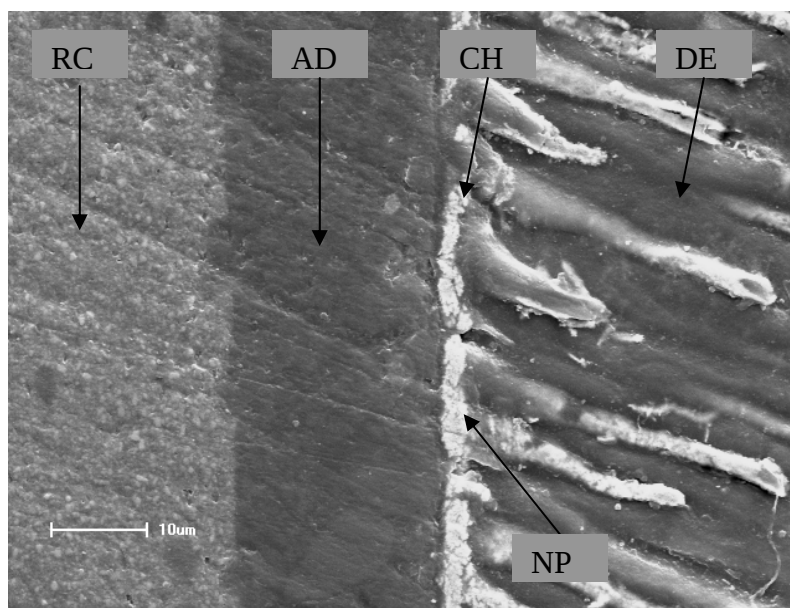


Figura 12 – Fotomicrografia da interface de união dentina (DE) e resina composta (RC) para o adesivo Adper Single Bond 2 (1200X). Observe na seta referente ao código NP a presença de nitrato de prata (NP). AD = Adesivo; CH = Camada híbrida.

Na Figura 13 (700x) e 14 (1200x), observa-se imagens ilustrativas para os dois sistemas adesivos. Quando se compara os diferentes grupos experimentais para cada um dos sistemas adesivos, nota-se uma homogeneidade com pouco depósito de prata na região da camada híbrida. Quando se observam comparativamente os dois sistemas adesivos, houve um maior depósito de prata no sistema adesivo PB (Figuras 13 e 14, A, B e C em comparação com as Figuras 13 e 14, D, E e F).

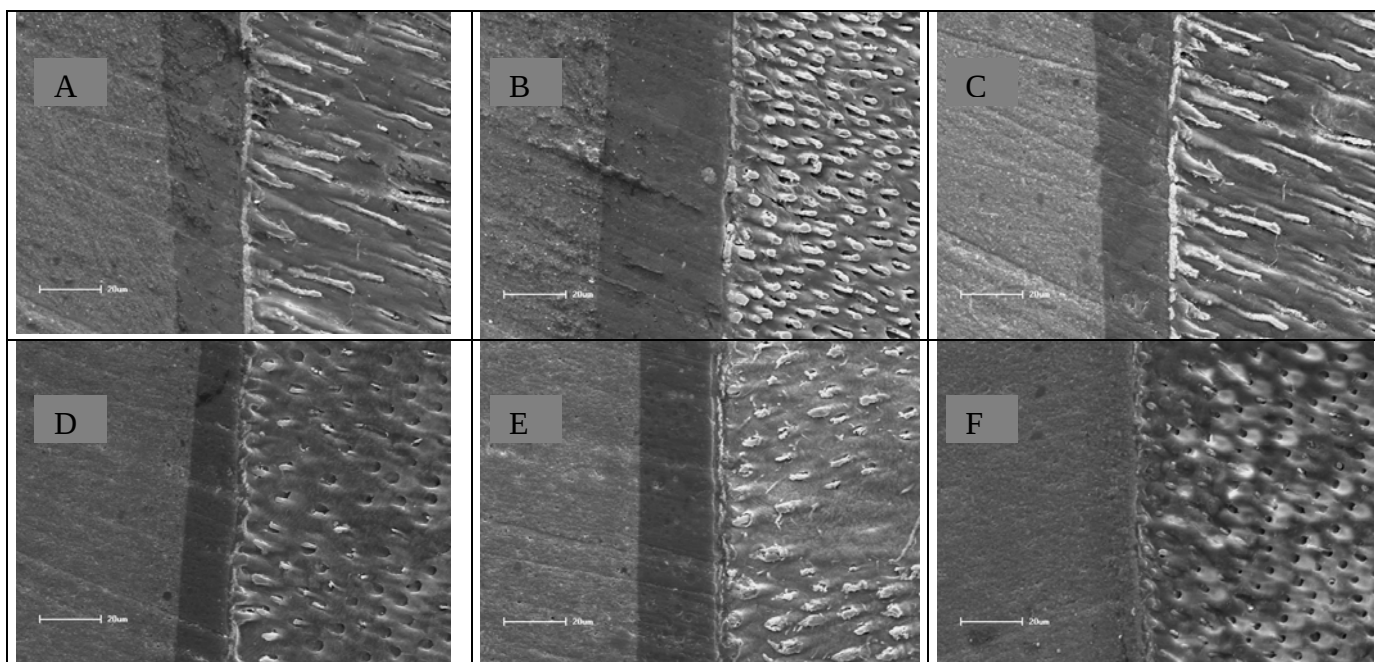


Figura 13 - Fotomicrografias dos grupos experimentais no tempo imediato. Em A) PB Controle; B) PB CHX 2%; C) PB Ac CHX 2%; D) SB Controle; E) SB CHX 2% e F) SB Ac CHX 2% no aumento de 700X.

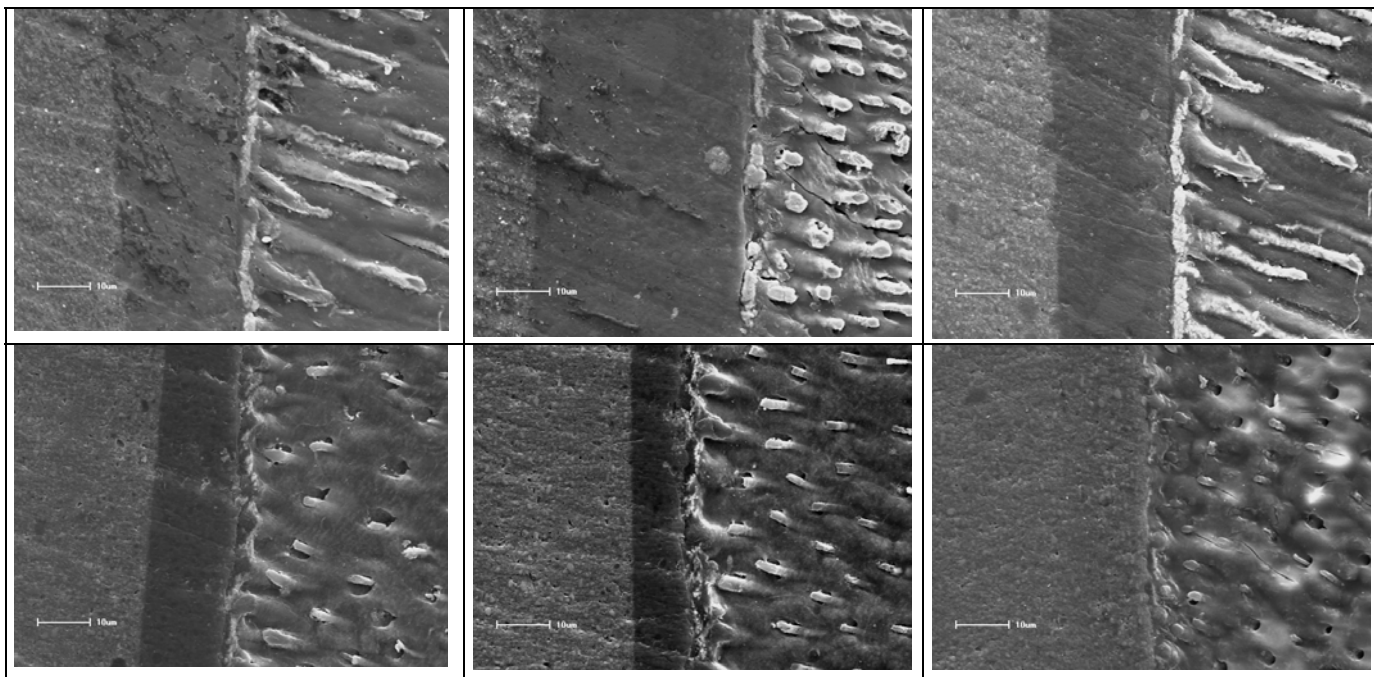


Figura 14 - Fotomicrografias dos grupos experimentais no tempo imediato. Em A) PB Controle; B) PB Ac CHX 2%; C) PB Ac CHX 2%; D) SB Controle; E) SB CHX 2% e F) SB Ac CHX 2% no aumento de 1200X.

As fotomicrografias ilustradas da interface de união entre dentina e resina composta para o adesivo PB e o adesivo SB a seguir representam a camada de adesivo formada; túbulos dentinários e parte da resina composta no tempo de 6 meses de armazenamento em água. Na figura 15 (700x) e 16 (1200x), observa-se imagens ilustrativas para os dois sistemas adesivos utilizados. Quando se comparam os diferentes grupos experimentais para cada um dos sistemas adesivos após 6 meses, nota-se uma grande quantidade de nitrato de prata nos grupos PB e SB controle na região da camada híbrida (Figuras 15 e 16, A e D em comparação com as Figuras 15 e 16, B, C, E e F).

Esta observação também em comparação a todos os grupos no tempo imediato (Figuras 13 e 14). Já os grupos onde a clorexidina foi aplicada, tanto em solução aquosa como no ácido fosfórico, houve pouca presença de depósito de prata na região da camada híbrida após 6 meses de armazenagem em água (Figuras 15 e 16, B, C, E e F). Quando se observam apenas os dois sistemas adesivos, continua havendo um maior depósito de prata no sistema adesivo PB (Figuras 15 e 16, A, B e C em comparação com as Figuras 15 e 16, D, E e F).

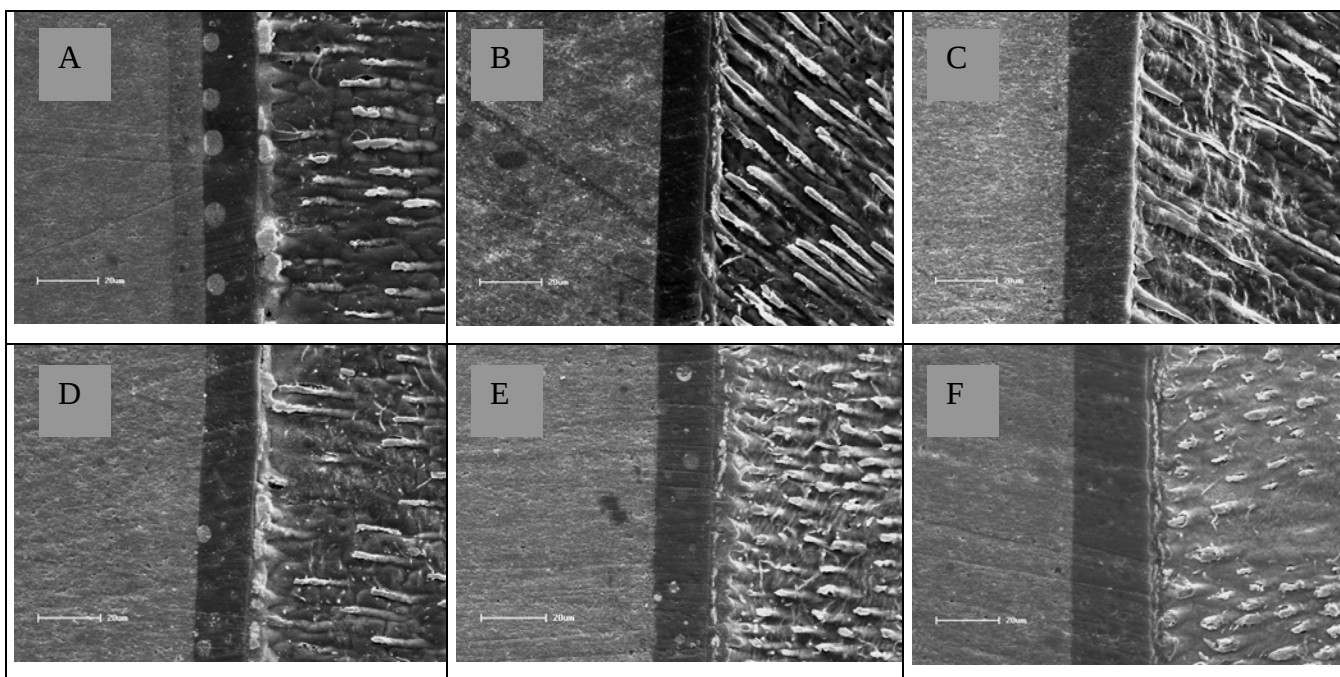


Figura 15 - Fotomicrografias dos grupos experimentais após 6 meses de armazenagem em água. Em A) PB Controle; B) PB CHX 2%; C) PB Ac CHX 2%; D) SB Controle; E) SB CHX 2% e F) SB Ac CHX 2% no aumento de 700X no tempo de 6 meses.

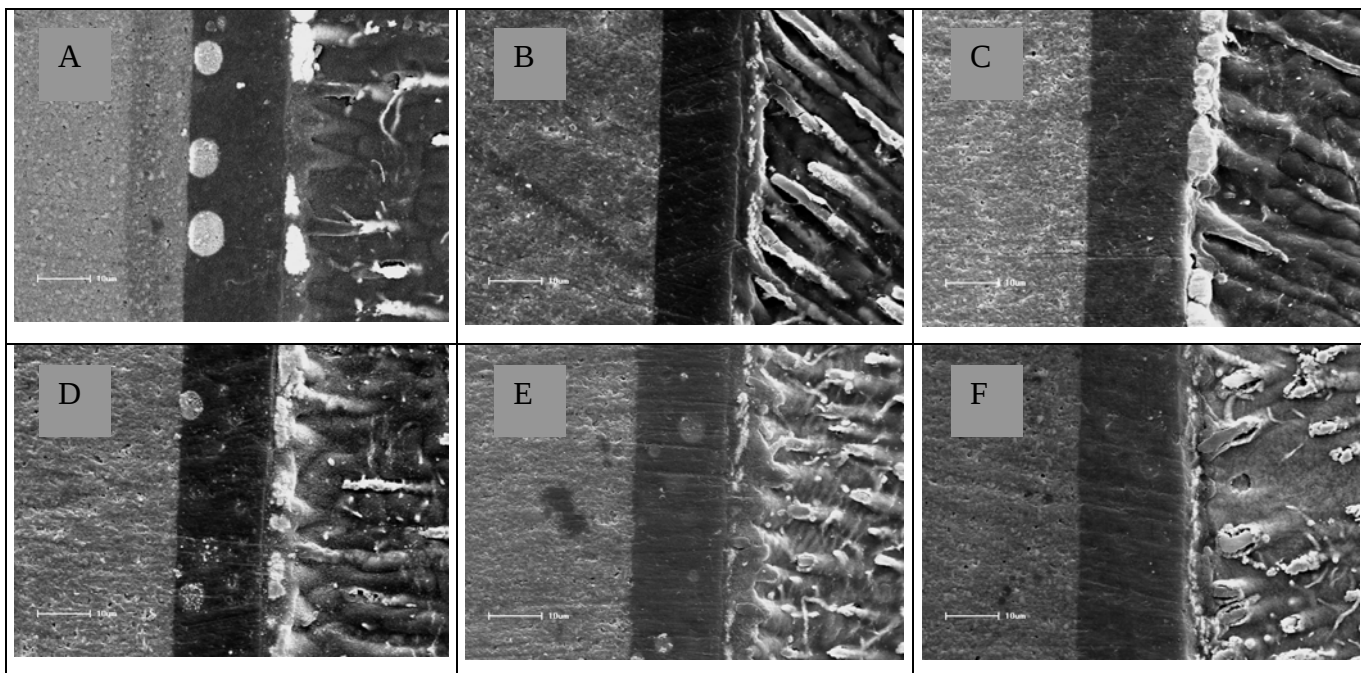


Figura 16 - Fotomicrografias dos grupos experimentais após 6 meses de armazenagem em água. Em A) PB Controle; B) PB CHX 2%; C) PB Ac CHX 2%; D) SB Controle; E) SB CHX 2% e F) SB Ac CHX 2% no aumento de 1200X no tempo de 6 meses.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que a utilização do digluconato de clorexidina a 2% previamente a aplicação dos sistemas adesivos ou a utilização do condicionamento ácido contendo clorexidina 2% em sua formulação não sofreu diminuição da resistência adesiva e nem aumento da deposição de nitrato de prata após a armazenagem em água por 6 meses. Em contrapartida, houve uma significativa degradação da união para os sistemas adesivos Prime&Bond NT e Adper Single Bond 2 quando aplicados conforme as recomendações de cada fabricante após 6 meses de armazenamento.

A redução da resistência mecânica da interface de união é frequentemente acompanhada por alterações morfológicas que revelam a desnaturação parcial ou completa de seus constituintes, isto é, dos compósitos de resina, dos sistemas de união e da dentina modificada pelo procedimento adesivo (Carrilho *et al.*¹⁰ 2007, Hashimoto *et al.*⁴³ 2000, Hebling *et al.*⁴⁵ 2005, Donmez *et al.*⁴⁶ 2005). O comprometimento isolado, ou em conjunto, desses componentes são os responsáveis por reduzir a sobrevida das restaurações adesivas (De Munck *et al.*⁶ 2004, Carrilho *et al.*²⁶ 2005). A degradação do componente resinoso é um dos fatores responsáveis pela redução dos valores de resistência de união observados ao longo do tempo de armazenamento em água.

A absorção de água pelo polímero atua como um agente plastificador, alterando parcialmente a energia de coesão das cadeias poliméricas (Jacobsen, Soderholm⁴⁷ 1995, Ferracane⁴⁸ 2006). No início, a presença da água causa a diminuição prematura das propriedades mecânicas do polímero (Carrilho *et al.*²⁶ 2005), que com o passar do tempo resulta em hidrólise de suas moléculas, condenando sua estrutura. Qualquer sistema adesivo disponível no mercado atualmente produzirá interfaces de união que cedo ou tarde apresentara degradação mecânica de sua estrutura (Ferracane⁴⁸ 2006).

A água é, de fato, o maior causador da degradação do colágeno. Dentro da camada híbrida dois modos de degradação são observados: falta de resina adesiva entre os espaços interfibrilares e fibras colágenas desprotegidas (Breschi

*et al.*³⁶ 2007). As fibras colágenas desprotegidas, ou seja, incompletamente hibridizadas, ficam susceptíveis a degradação com a permanência de solvente residual entre seus espaços ou insuficiente remoção de água. Nesse contexto, quando realizamos o condicionamento ácido, ocorre uma desnaturalização do colágeno e este é parcialmente exposto onde há uma ação proteolítica dos componentes da própria matriz de dentina desmineralizada ou da dentina adjacente à camada híbrida que começa a ser sustentada por inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* (Hebling *et al.*⁴⁵ 2005; Mazzoni *et al.*³⁴ 2006; Carrilho *et al.*¹⁰ 2007). Esses estudos trabalham com a hipótese de que a proteólise do colágeno se daria pela re-ativação das metalo-proteinases (MMPs), proteínas não-colagênicas que constituem parte da matriz extracelular da dentina.

As metaloproteinases (MMPs) constituem um grupo de pelo menos vinte e duas (22) enzimas presentes na matriz extracelular dos tecidos dos mamíferos, em que se observa intensa atividade metabólica de remodelação e degradação de vários tipos de colágeno. Algumas MMPs se envolvem na amelogênese e dentinogênese onde sinalizam que essas enzimas possam permanecer inativas na matriz extracelular do esmalte e dentina após o processo de mineralização dos mesmos (Van Strijp *et al.*²⁹ 2003). Durante os procedimentos de união dos compósitos de resina aos tecidos dentais, a dentina é condicionada por soluções ou monômeros ácidos tendo, assim, parte de sua estrutura mineral removida. Assim, é perfeitamente razoável prever que, neste momento, não apenas o colágeno seja exposto, mas também proteínas não-colagênicas, como por exemplo, enzimas proteolíticas (MMPs, catepsinas etc). Se durante a aplicação da resina adesiva, os monômeros fossem eficientes em infiltrar-se completamente por todos os espaços interfibrilares da dentina, co-polimerizando-se, provavelmente as MMPs expostas pelo condicionamento ácido seriam “fossilizadas”, permanecendo inativas.

Entretanto, sabe-se que os sistemas de união disponíveis e inclusive os utilizados nesse estudo (Prime&Bond NT e Adper Single Bond 2), invariavelmente, falham nesta infiltração (Wang, Spencer²⁸ 2003), portanto inúmeros sítios da matriz dentinária poderão permanecer expostos. Observe que, em todos os

grupos experimentais no tempo imediato, ocorreu a deposição em maior ou menor grau de nitrato de prata na região da camada híbrida, indicando possivelmente a falha de penetração do adesivo na dentina desmineralizada. Se isto ocorrer, há suspeita de que as MMPs expostas possam de alguma forma participar da degradação do colágeno exposto durante o procedimento adesivo (Pashley *et al.*²⁵ 2004).

Os inibidores teciduais das metalo-proteinases (TIMPs), são proteínas glicosadas de baixo peso molecular que participam da regulação do metabolismo da matriz extracelular e inibem, com diferentes graus de efetividade, a atividade de todos os tipos de MMPs (Sorsa *et al.*⁴⁹ 2006).

O digluconato de clorexidina (CHX) é um composto orgânico conhecido por sua potente ação anti-séptica e antibacteriana, que age sobre um largo espectro de microorganismos entre gram-positivos, gram-negativos, fungos e alguns tipos de vírus (Stanley *et al.*⁵⁰ 1989). Mostra-se efetivo na inibição de pelo menos três tipos de metalo-proteinases MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (Gendron *et al.*¹¹ 1999). Os autores acreditam que o efeito inibitório da clorexidina sobre essas metaloproteinases se deve a uma ação quelante, seqüestradora de cálcio. As propriedades antiproteolíticas da CHX parecem ser efetivas até mesmo em baixas concentrações. Em nosso estudo, utilizamos a concentração de 2% como em Carrilho¹⁰ (2007), Hebling⁴⁵ (2005) e De Castro⁵¹ (2003). Em todos esses estudos, a aplicação ou não da clorexidina a 2% não influenciou nos valores de resistência imediata de união. Já quando a aplicação da clorexidina foi avaliada ao longo do tempo, os autores destes estudos são unânimes em apontar os benefícios causados por sua aplicação.

A clorexidina é interessante do ponto de vista clínico, uma vez que, já tem sido amplamente utilizada para limpeza de preparos cavitários, atuando como agente desinfetante sobre esmalte ou dentina afetada por cárie, antes da realização das restaurações (Gendron *et al.*¹¹ 1999, Castro *et al.*⁵¹ 2004, Hebling *et al.*⁴⁵ 2005).

Em outros estudos a utilização de CHX após o condicionamento ácido mostrou não comprometer a adesão dos sistemas adesivos convencionais ou

autocondicionantes (Castro *et al.*⁵¹ 2003, Hebling *et al.*⁴⁵ 2005, Carrilho *et al.*¹⁰ 2007). Adicionalmente, estudos *in vivo* (Hebling *et al.*⁴⁵ 2005) e *in vitro* (Carrilho *et al.*⁵² 2007) indicam que a aplicação da solução de clorexidina após o condicionamento da dentina e previamente ao uso de adesivos convencionais pode desacelerar o processo de degradação das interfaces adesivas, podendo constituir uma ferramenta clínica útil na busca de maior longevidade das restaurações adesivas.

O maior inconveniente seria que a sua utilização rotineira levaria ao acréscimo de mais um passo operatório nos procedimentos adesivos convencionais, ocasionando um aumento do tempo gasto para o procedimento adesivo. Hoje em dia, há uma tendência dos fabricantes em simplificação dos procedimentos adesivos. Devido a este dilema, pensou-se que a incorporação de digluconato de clorexidina na seringa do condicionamento ácido poderia ser uma opção.

Os nossos resultados demonstraram que, a aplicação do ácido fosfórico com clorexidina apresentou a capacidade de inibir a degradação da união, em especial para o adesivo Prime&Bond NT, indicando que a clorexidina presente no condicionador ácido teve a capacidade de diminuir a ação de MMPs na dentina que foi previamente desmineralizada. Na realidade, a ação do ácido fosfórico com clorexidina deve ser visto por dois prismas. O primeiro é que, a despeito, do próprio condicionador ácido ocasionar a exposição de MMPs, ele devido ao seu baixíssimo pH (Kenshira *et al.*⁵³ 2003) é também um inibidor. Pashley *et al.*²⁴ (2004) demonstraram isto experimentalmente ao mensurar a atividade colagênica de pó de dentina. A atividade quando da aplicação do condicionamento ácido foi semelhante estatisticamente à atividade quando no pó de dentina foram aplicados inibidores de proteases. O segundo é devido à ação da clorexidina em si, inibindo as MMPs, conforme descrito neste estudo. Contudo, grande parte desta inibição deve ser atribuída a ação residual da clorexidina presente no condicionador ácido (Pashley *et al.*²⁴ 2004).

O uso da CHX tem se mostrado promissor na minimização da degradação das interfaces adesivas, mas alternativas devem ser pesquisadas, uma vez que

um dos objetivos da odontologia restauradora é produzir interfaces adesivas permanentemente estáveis. Estudos indicam outros inibidores de MMPs como, por exemplo, as tetraciclinas (Gendron *et al.*¹¹ 1999, Sorsa *et al.*⁴⁹ 2006). Um comum agente antimicrobiano amplamente utilizado em pacientes com câncer. Outro inibidor derivado das tetraciclinas seria as tetraciclinas quimicamente modificadas. Seu mecanismo de ação resulta da sua habilidade de ligar-se a íons cálcio e zinco os quais são requeridos para manter e promover a atividade hidrolítica (Acharya *et al.*⁵⁴ 2004). Outra alternativa são os inibidores naturais como por exemplo o abacate e o feijão derivado de soja não saponificável. Tem mostrado efetividade na redução do controle da dor articular e propriedades inibitórias de MMPs *in vitro* (Chaussian-Miller *et al.*⁵⁵ 2005, Birkedal-Hansen *et al.*⁵⁶ 1993).

Alguns estudos consideram o EDTA como um biomodificador promissor por apresentar excelente capacidade de remover a *smear layer* e expor a matriz colágena dentinária trabalhando em pH neutro, conferindo ao EDTA propriedade de não interferir com a vitalidade tecidual como fazem os agentes condicionantes ácidos (Blomlof *et al.*⁵⁷ 1995). Dessa maneira podemos desmineralizar a dentina com EDTA (0,5M) por 5 minutos, tempo necessário para gerar um padrão de desmineralização similar ao produzido por 15 segundos de aplicação de ácido fosfórico, assim combinamos o efeito de remoção da *smear layer*, exposição do colágeno à prevenção da atividade collagenolítica da dentina, uma vez que os íons de cálcio necessários à ação das collagenases são quelados pelo EDTA (Martin-De Las Heras *et al.*⁵⁸ 2000; Pashley *et al.*²⁵ 2004).

Uma frente de estudo poderia buscar o conhecimento de outras soluções inibitórias de atividade de MMPs ou testar também a efetividade da incorporação de inibidores de MMPs nos próprios materiais restauradores como foi o caso do presente estudo com o ácido com clorexidina em sua formulação. Porém é fundamental a avaliação de técnicas e materiais restauradores que possam garantir a perfeita infiltração de monômeros mais estáveis e de preferência mais hidrofóbicos, assim, os fatores responsáveis pela degradação das interfaces adesivas, resina e colágeno exposto estariam mais protegidos de fontes

promotoras de deterioração como água, enzimas salivares ou enzimas proteolíticas.

O aprimoramento dos compósitos de resina para uso odontológico tem nos permitido importante avanço na técnica restauradora, viabilizando procedimentos mais conservadores e estéticos. Inúmeros estudos têm consistentemente revelado a fragilidade e a susceptibilidade das restaurações adesivas frente a condições adversas a que estão submetidas quando encerradas na cavidade oral. Portanto, a determinação dos fatores envolvidos na durabilidade das estruturas que compõem essas restaurações, não somente conduz à compreensão dos mecanismos que regem a estabilidade e ou degradação das interfaces adesivas, como também pode fundamentar o estabelecimento de condutas clínicas que promovam a preservação destas restaurações indefinidamente, ou na melhor das hipóteses por períodos muito mais longos que são atualmente verificados.

A durabilidade de união entre sistemas adesivos e substratos dentais é de grande importância para a longevidade clínica das restaurações adesivas. Estudos investigando a durabilidade das restaurações adesivas têm demonstrado que substâncias presentes nos fluídos orais, como água e enzimas salivares, podem atuar na degradação dos componentes que constituem a interface de união (Hashimoto *et al.* ⁴³ 2000, De Munck *et al.* ⁴⁴ 2005). Outros estudos que comprovem as hipóteses aqui levantadas devem ser realizados.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo conclui-se que:

- 1) A utilização do digluconato de clorexidina a 2% previamente à aplicação dos sistemas adesivos e a utilização do condicionador ácido com digluconato de clorexidina a 2% interferiu na resistência imediata de união entre os sistemas adesivos testados;
- 2) Para os dois sistemas adesivos testados, não ocorreu degradação ao longo do tempo (diminuição da resistência de união e aumento do padrão de deposição do nitrato de prata) pelo uso da clorexidina em solução ou através do uso de um condicionador ácido contendo clorexidina em comparação com os grupos em que a clorexidina não foi utilizado.

REFERÊNCIAS *

1. Van Meerbeeck B, De Munck, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, *et al.* Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003; 28:215-35.
2. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent.* 2004; 17: 104-8.
3. Wang Y, Spencer P. Hibridization efficiency of the adhesives/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003; 82: 141-5
4. Burrow MF, Tagami J, Hosoda H. The long-term durability of bond strength to dentin. *Bull Tokyo Med Dent Univ.* 1993; 40: 173-91.
5. Shirai K, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Suzuki K Shintani H, Van Meerbeek B. Effect of cavity configuration and aging on bonding effectiveness of six adhesives to dentin. *Dent Mater.* 2005; 21: 110-124.
6. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y,. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2004; 82: 136-140.
7. 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
8. Perdigão J, Denehy GE, Swift EJ Jr. Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths. *Am J Dent.* 1994; 7: 81-84.

* De acordo com a norma do Programa de Mestrado em Odontologia da UEPG, baseada no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. Filler SJ, Lazarchik DA, Retief DH, Heaven TJ. Shear bond strengths of composite to chlorhexidine-treated enamel. *Am J Dent*. 1994; 7: 85-88.
10. Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L. *et al* In vivo preservation of the hybrid layer by CHX. *Journal Dental Research*. 2007a; 86: 90-94.
11. Gendron R, Greiner D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999; 6:437-39.
12. Swfit Jr EJ, Perdigão J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: A brief history and state of the art. *Quintessence Int*. 1995; 26:95-110.
13. Lopes GC, Baratieri LN, Andrada MAC, Vieira LCC. Dental adhesion: present state of the art and future perspectives. *Quintessence Int*. 2002; 33:213-24.
14. Pashley DH, Carvalho RM. Dentin permeability and dentin adhesion. *J Dent*. 1997; 25:355-72.
15. Carvalho RM, Carrilho MR de O, Pereira LCG, Garcia FCP, Marquesini L Jr, Silva SMD *et al*. Sistemas adesivos: fundamentos para a compreensão de sua aplicação e desempenho em clínica. *Biodonto*. 2004; 2(1):1-89.
16. Nakabayashi N, Pashley DH. Hybridization of Dental Hard Tissues. *Quintessence*. 1998; 24: 54-56.
17. Tay FR, King NM, Chan K Pashley DH. How can nano-leakage occur in self-etching adhesives systems that demineralize and infiltrate simultaneously? *J Adhes Dent*. 2002; 4: 255-269.
18. Garone Filho W. Adesão em esmalte e dentina. São Paulo. Ed Maio; 2002.

20. Miyazaki M, Platt JA, Onose H, Moore BK. Influence of dentin primer application methods on dentin bond strength. *Oper Dent*. 1996; 21:167-72.
21. Cho B, Dickens SH. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent Mater*. 2004; 20:107-15.
22. Hashimoto M, Sano H, Yoshida E, Hori M, Kaga M, Oguchi H, Pashley DH. Effects of multiple adhesive coatings on dentin bonding. *Oper Dent*. 2004; 29:416-23.
23. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res*. 1998; 77:50-9.
24. Miyazaki M, Onose H, Moore BK. Analysis of dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent Mater*. 2002; 18:576-80.
25. 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.
26. Carrilho MRO, Tay FR, Pshley DH, *et al*. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater*. 2005; 21: 232-241.
27. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigarni M, Tagami J, Pshley DH. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, *in vivo*. *J Dent Res*. 1999; 78: 906-11.
28. Wang Y, Spencer P. Hibridization efficiency of the adhesives/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res*. 2003; 82: 141-5.

29. Van Strijp AJ, Jansen DC, De Groot J, *et al.* Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res.* 2003; 37:58-65.
30. Tjäderhane L, Palossari H, Sulkala M, Wahlgren J, Salo T. The expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in human odontoblasts. In: *Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex*; 2002. p.45-51.
31. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92: 827-39.
32. Davies GE *et al.* Laboratory investigation of a new anti-bacterial agent of high potency. *British J Pharmacol.* 1954; 9: 192-96.
33. Silva CRG, Jorge AOC. Avaliação de desinfetantes de superfície utilizados em odontologia. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16: 107-114.
34. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y *et al.* Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomater.* 2006; 27: 4470-4476.
35. King NM, Tay FR, Pashley DH, Hashimoto M, Ito S, Brackett WW. Conversion of one-step to two-step self-etch adhesives for improved efficacy and extend application. *Am J Dent.* 2005; 18: 126-34.
36. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano. Dental Adhesion review: aging and stability of bonded interface. *Dental Mater.* 2007; 24: 90-101.
37. Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y, Ebisu S. An in vivo evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesives system incorporating MDPB. *Dental Mater.* 2006; 23: 170-6.

38. De Wald JP. The use of extracted teeth for in vivo bonding studies: a review of infection control considerations. *Dent Mater.* 1997;13:74-81.
39. Reis A, Grande RHM, Oliveira GMS, Lopes GC, Loguercio AD. A 2year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. *Dental Mater.* 2006; 22: 1150-6.
40. Reis A, Loguercio AD, Azevedo CLN, Carvalho RM, Singer JM, Grande RHM. Moisture spectrum of desmineralized dentin for different solvent-based adhesives system. *J Adhes Dent.* 2003; 5:183-192.
41. Asmussen E, Peutzfeld A. The influence of relative humidity on the effect of dentin bonding systems. *J Adhes Dent.* 2001;3:123-7.
42. Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res.* 2002; 81: 472-6.
43. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, *et al.* (2000). In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000; 79: 1385-1391.
44. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P *et al.* A critical review of durability of adhesion to tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005; 84: 118-32.
45. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine Arrests Subclinical Degradation of Dentin Hybrid Layers in vivo. *J Den Res.* 2005; 84: 741-6.
46. Donmez N, Belli S, Pashley DH *et al.* Ultrastructural correlates of in vivo in vitro bond degradation in self-etch adhesives. *J Den Res.* 2005; 84: 355-359.

47. Jacobsen T, Soderholm KJ. Some effects of water on dentin bonding. *Dent Mater.* 1995; 11: 132-136.
48. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006; 22: 211-222.
49. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006; 38: 306-21.
50. Stanley A, Wilson M, Newman HN. The *in vitro* effects of chlorheridine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol.* 1989; 16: 259-64.
51. Castro FL, de Andrade MF, Duarte Junior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent.* 2003; : 129-38.
52. Carrilho MRO, Carvalho RM, de Góes MF, *et al.* Chlorhexidine Preservs Dentin Bond in vitro. *J Dent Res.* 2007b; 86: 90-94.
53. Hashimoto M, Tay FR, Ito S, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Permeability of adhesives resin interfaces after long-term function. *Am J Dent.* 2001; 14: 211-5.
54. Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resis Up.* 2004; 7: 195-208.
55. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Human Caries. *Crit Rev in Oral Bio and Med.* 2005; 14: 334-345.

56. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, Engler JA. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Crit Rev in Oral and Med.* 1993; 4: 197-250.
57. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metaloproteinases gelatinase A in human Dentine. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 757-765.