

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

RODRIGO STANISLAWCZUK GRANDE

**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS ADESIVOS MODIFICADOS POR DIACETATO DE
CLOREXIDINA**

**PONTA GROSSA
2012**

RODRIGO STANISLAWCZUK GRANDE

**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS ADESIVOS MODIFICADOS POR DIACETATO DE
CLOREXIDINA**

Tese apresentada para
obtenção do título de Doutor na
Universidade Estadual de Ponta
Grossa no Curso de Doutorado
em Odontologia – Área de
concentração Dentística
Restauradora.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio

**PONTA GROSSA
2012**

Catálogo na Fonte
Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

G751a Grande, Rodrigo Stanislawczuk
Avaliação de sistemas adesivos modificados por diacetato de clorexidina / Rodrigo Stanislawczuk Grande. Ponta Grossa, 2012
159 f.

Tese (Doutorado em Odontologia – área de concentração :
Dentística Restauradora), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio.

1. Adesivo. 2. Clorexidina. 3. Resistência de união. 4. Dentina. I.
Loguercio, Alessandro Dourado. II. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Doutorado em Odontologia. III. T.

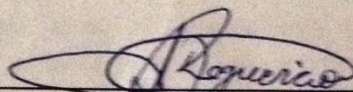
CDD: 617.6

RODRIGO STANISLAWCZUK GRANDE

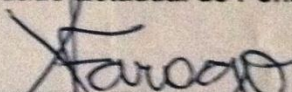
**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS ADESIVOS MODIFICADOS POR DIACETATO DE
CLOREXIDINA**

Tese apresentada para obtenção do título de doutor na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado e Doutorado em Odontologia - Área de concentração em Dentística Restauradora.

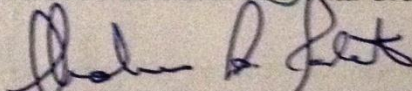
Ponta Grossa, 30 de novembro de 2012



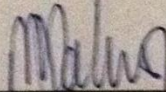
Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



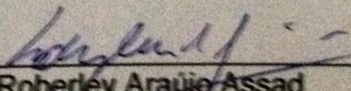
Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Co-Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Abraham Lincoln Calixto
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Vicente de Paulo Aragão Sabóia
Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Roberley Araújo Assad
Faculdade São Leopoldo Mandic

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus queridos pais Oswaldir e Regina, que merecem reconhecimento especial em gratidão pelo apoio, amor 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.

Vocês são inspirações para tudo que há de nobre e conquistas em minha vida.

AMO VOCÊS.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

Ao **Prof. Dr. Paulo Vitor Farago**, da Área de Farmácia e Bioquímica da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que nessa fase de doutoramento orientou me em parte importantíssima deste trabalho também contribuindo de maneira ímpar para o meu crescimento científico e humano com sua sabedoria, amizade e dedicação.

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

A vocês serei sempre grato.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de tudo e todos, Ser supremo capaz de iluminar minha existência e me fazer acreditar na possibilidade e na conquista do sucesso. Agradeço por me dar força e coragem para superar momentos difíceis, me protegendo para que eu possa continuar alcançando meus objetivos.

Aos Ausentes que de maneira direta e ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento espiritual e paz interior.

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 Federal do Paraná, Universidade do Oeste de Santa Catarina pela amizade, atenção e alegria sempre dispostos a colaborar em todos os momentos.

Aos funcionários desta Universidade de maneira geral mas em especial ao técnico do laboratório do MEV, Dr. Milton Michel (co-autor de algumas publicações nossas, a secretária da pós graduação Morgana pela prontidão, boa vontade em ensinar e amizade consolidada ao longo dos anos.

Aos amigos do Curso de Doutorado, Vânia, Gislaíne, Michele, Cristiana, Márcio, e todos os outros por todos os bons e maus momentos compartilhados e ajuda.

Aos meus amigos em especial Cristian e Douglas que de maneira mais direta contribuíram e me ajudaram em todas as horas. A vocês o meu carinho especial.

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

A Prefeitura Municipal de Ponta Grossa onde sou dentista concursado; a Ortodontic Center (Clínica Odontológica); a Rodonorte onde também sou prestador de serviço; ao Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais - CESCAGE - onde ministro aulas de graduação e Pós Graduação o meu muito obrigado e desculpando-se pelas ausências e as vezes pela falta de tempo de dedicação.

A todos os outros consultórios que trabalhei e não foram aqui mencionados.

DEUS,

nosso Pai e criador, que sois todo poder e bondade, daí força àquele que passa pela provação; daí luz àquele que procura a verdade, pondo no coração do homem a compaixão e a caridade. Deus, daí ao viajante a estrela guia; ao aflito a consolação; ao doente o repouso. Pai, daí ao culpado o arrependimento, ao espírito a verdade, a criança o guia, ao órfão o pai. Senhor, que a vossa bondade se estenda sobre tudo que Criastes. Piedade Senhor, para aqueles que não vos conhecem, esperança para aqueles que sofrem. Que a Vossa bondade permita aos espíritos consoladores derramarem por toda parte a paz, a esperança e a fé. Deus, um raio, uma faísca do Vosso amor pode abrasar a terra. Deixa-nos beber nas fontes dessa bondade fecunda e infinita e todas as lágrimas secarão, todas as dores acalmar-se-ão. Um só coração, um só pensamento subirá até Vós como um grito de reconhecimento e amor. Como Moisés sobre a montanha, nos Vós esperamos com os braços abertos, oh! Poder... oh! Bondade... oh! Beleza... oh! Perfeição, e queremos de alguma sorte alcançar a Vossa misericórdia. Deus, daí-nos a força de ajudar o progresso a fim de subirmos até Vós. Dai-nos a caridade pura; daí-nos a fé e a razão; daí-nos a simplicidade que fará de nossas almas, o espelho onde deve refletir a Vossa Santa e Misericordiosa imagem.

(Prece de Carítas adaptada por Divaldo Pereira Franco)

DADOS CURRICULARES

RODRIGO STANISLAWCZUK GRANDE

NASCIMENTO: 15 DE DEZEMBRO DE 1980; PONTA GROSSA; PARANÁ

FILIAÇÃO: ROZALVO GRANDE E REGINA STANISLAWCZUK

1999 - 2003 CURSO DE GRADUAÇÃO PELA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA

2004 – 2005 CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ORTDONTIA (CABRERA &
CABRERA)

2006 – 2008 MESTRADO EM DENTÍSTICA RESTAURADORA PELA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE PONTA GROSSA

2009 – 2012 DOUTORADO EM DENTÍSTICA RESTAURADORA PELA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Grande RS. Avaliação de sistemas adesivos modificados por diacetato de clorexidina. [Tese de Doutorado]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa UEPG; 2012.

RESUMO

O efeito da clorexidina (CHX) como agente para preservar a união tem sido bem estabelecido, mas pouco se sabe sobre a inclusão da CHX nos sistemas adesivos convencionais simplificados. Objetivos: 1) avaliar no tempo imediato o efeito da adição de diferentes concentrações de clorexidina (CHX 0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,2%) em dois adesivos simplificados Ambar (AM) e XP Bond (XP) nas propriedades adesivas (resistência de união [RU] e nanoinfiltração [NI]) e físicas (nanoindentação [NP] e módulo de elasticidade [ME]) à dentina (experimento 1); 2) avaliar ao longo de doze meses o efeito da adição da CHX no AM e XP nas propriedades adesivas (resistência de união [RU] e nanoinfiltração [NI]) à dentina (experimento 2); 3) avaliar ao longo de 28 dias a adição de CHX no AM e XP nas características de sorção (SA), solubilidade (SO) e a liberação de clorexidina em água (experimento 3). Metodologia: para o experimento 1 e 2 foram utilizados molares humanos até a exposição da dentina oclusal. Os dentes foram divididos de acordo com as diferentes concentrações de clorexidina e tempo de armazenamento: sem CHX (controle); com 0,01%; 0,05%; 0,1%; e 0,2% de diacetato de CHX, testados imediatamente e ao longo de 12 meses. Após aplicação dos adesivos AM e XP, restaurações de resina composta foram realizadas. Cada dente foi cortado para obtenção de “palitos” que foram divididos de acordo com as propriedades a serem testadas e o tempo de armazenamento. Para RU, os palitos foram testados em tração (0,5mm/min). Para NP e ME foram testados em um nanodurômetro e para o teste de NI, os “palitos” foram corados com nitrato de prata e avaliados através de EDS em MEV. Para cada teste foi aplicada a análise estatística apropriada. Para o experimento 3 foram confeccionados espécimes na forma de discos e posterior verificação da sorção, solubilidade e liberação de CHX. As mesmas concentrações de adesivos foram utilizadas. Para SA e SO, os espécimes após fotoativação foram desidratados (m1) e armazenados em água durante 28 dias para avaliação gravimétrica úmida (m2) e após nova desidratação (m3) da sorção (m2-

m3/volume) e solubilidade (m1-m3/volume). Resultados: A inclusão de diferentes concentrações de CHX não afetou as propriedades adesivas e físicas dos adesivos testados (experimento 1). Nos grupos controles dos dois adesivos testados (AM e XP), ocorreu degradação da resistência de união e aumento da quantidade de nitrato de prata após 12 meses de armazenamento em água, fato este que não ocorreu quando a CHX foi adicionada, independente da concentração (experimento 2). A adição de CHX não afetou a SA e SO, quando comparado com os respectivos grupos controle. Ocorreu liberação de CHX por todo o período do experimento, sendo maior nas primeiras 24 h (experimento 3). Conclusão: a incorporação de CHX ao adesivo não afetou de maneira imediata as propriedades adesivas e físicas de união a dentina, nem a sorção e solubilidade, mas preservou a união ao longo de 12 meses, além de liberar clorexidina por todo o período avaliado.

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

Grande RS. Evaluation of diacetate chlorhexidine-containing adhesives. [PhD thesis]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa UEPG; 2012.

ABSTRACT

The aim of this work were investigate the microtensile bond strength (μ TBS), nanoleakage (NL), nano-hardness (NH) and Young's modulus (YM) of resin-dentin bonding components produced by two simplified etch-and-rinse adhesive with different concentrations of chlorhexidine diacetate (CHX). 99.9% of CHX were added to Ambar (FGM) and XP Bond (Dentsply) in concentrations of 0, 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2 wt%. Resin-dentin bonded sticks (0.8 mm^2) were prepared for μ TBS testing (0.5 mm/min). For NL, some bonded sticks from each tooth were used. Nano-indentations were made on the adhesive interface and NH and YM calculated. The results of μ TBS, NL and NH and YM of the hybrid layers of the CHX-free and CHX-containing adhesives were statistically similar ($p > 0.05$) on immediately time. After 12 months, significant reductions of μ TBS were observed for both adhesives in the control group ($p < 0.05$). In CHX-containing adhesives or CHX-free groups the BS remained stable for both systems. NL was more evident in the control than in the experimental groups ($p < 0.05$) both in IM and 12 months periods. Conclusions: CHX in concentrations lower than 0.1 wt% incorporated in the two simplified etch-and-rinse adhesives did not impair the immediate resin-dentin bond strength, nanoleakage and mechanical properties of the adhesive and hybrid layers.

Keywords: Adhesive. Chlorhexidine. Bond-strength. Dentin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Diagrama 1 -	Delineamento experimental do estudo 1.	31
Diagrama 2 -	Delineamento experimental do estudo 2.	31
Diagrama 3 -	Delineamento experimental do estudo 3.	32
Figura 1 -	Imagens dos dentes intactos e B) com a oclusal desgastada.	33
Figura 2 -	A) Condicionamento ácido realizado; B) aplicação do adesivo e C) confecção dos incrementos de resina composta.	34
Figura 3 –	Fotoativação incremental da resina composta com aparelho de fotoativação halógena	34
Figura 4 –	Corpo de prova (CP) fixado no anel que se acopla à máquina de corte.	35
Figura 5 –	Corpo de prova cortado longitudinal e transversalmente.	36
Figura 6 –	A) paquímetro digital para a medição da área dos cp B) máquina utilizada para o teste de microtração e C) garra para o teste de microtração.	36
Figura 7 –	Corpo de prova colado ao dispositivo para realização de microtração.	37
Figura 8 –	A) CP confeccionado; B) CP isolado com esmalte (apenas a interface dente/restauração exposta) e C) CP infiltrado com nitrato de prata.	38
Figura 9 –	Matriz de PVC confeccionada para o embutimento dos CP (dimensões: 2 cm de diâmetro e 1 cm de altura).	38
Figura 10 –	A) CP fixados na fita dupla face, envoltos pela matriz	39

	previamente isolada; B) resina acrílica incolor sobre os CPS.	
Figura 11 –	Seqüência de pastas diamantadas (Arotec) utilizadas no polimento das amostras, granulação decrescente 1 µm (rosa), ¼ µm (roxa) e 0,05 µm (verde).	40
Figura 12 –	Cuba ultra-sônica utilizada nos banhos entre os agents polidores.	40
Figura 13 –	A) amostras polidas; B) amostras já desmineralizadas dentro de um recipient contendo sílica desidratada (azul).	41
Figura 14 –	Metalizador para as amostras do MEV o detalhe à esquerda mostra o equipamento em funcionamento.	41
Figura 15 –	Microscópio Eletrônico de Varredura.	42
Figura 16 -	Vista do nanoidentador composto pela cabine isoladora e pelo conjunto de programação e controle formado pela estação de trabalho com seus periféricos: dois monitores de imagens e uma impressora.	43
Figura 17 -	Polimento metalográfico. A) polimento da amostra com lixas de decrescentes abrasividades. B) e C) polimento das amostras com disco de feltro e pasta diamantada.ens e uma impressora.	44
Figura 18 -	A) porta-amostra com palitos polidos. B) observação em microscópio óptico das superfícies devidamente polidas necessárias para o experimento de nanoindentação.	44
Figura 19 -	A) vista mais aproximada do dispositivo de ensaios onde se realizam as nano-indentações; B) ponta de diamante piramidal de base triangular Berkovich.	45
Figura 20 -	Desenho esquemático mostrando as quatro regiões	46

distintas contendo dois grupos de nove indentações para cada região: (R1) corresponde à resina composta, (R2) corresponde ao centro de massa relativa da espessura da camada de adesivo dentinário, (R3) na região superior da massa relativa da espessura da camada híbrida e (R4) corresponde à dentina.

Figura 21 -	Representação esquemática da curva típica da carga aplicada (mN) versus profundidade de penetração (nm) realizada para cada indentação na amostra.	47
Figura 22 -	A) matriz utilizada para confecção dos corpos de prova; B) aplicação de vaselina; C) colocação de uma tira de poliéster na base da matriz metálica.	51
Figura 23 -	A) remoção do excesso de vaselina; B) gotejamento do adesivo.	51
Figura 24 -	Colocação da tira de poliéster; B) fotoativação dos espécimes.	52
Figura 25 -	A) CP pronto na matriz metálica; B) remoção dos excessos de adesivo com lâmina de bisturi e C) CP pronto fora da matriz.	52
Figura 26 -	A) CPS dessecados em sílica e B) pesados em balança de precisão.	53
Figura 27 -	A) CPS concluído e B) cálculo do volume no detalhe mostrando a mensuração do r .	53
Figura 28 -	A) Armazenamento em 10 ml de água destilada e mensuração do m_2 a cada 1 h (por 8 h), após 24 h, todos os dias por uma semana, 14 e 28 dias.	54
Figura 29 -	A) Nova desidratação e B) mensuração do m_3 .	55
Figura 30 -	Curva analítica de regressão linear da clorexidina.	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A – Fratura adesiva

M – Fratura mista

Bis-EMA – bisfenol etóxi metacrilato

Bis-GMA - bisfenol glicidil metacrilato

BPDM - bisfenil dimetacrilato

C – Fratura coesiva

cp - corpo(s) de prova

cm - centímetro (s)

cm² - centímetro (s) quadrado (s)

COEP - Comissão de Ética em Pesquisa

EUA - Estados Unidos da América

h - hora (s)

HEMA - 2-hidroxietil metacrilato

I – Tempo imediato

J/cm³ - joule (s) por centímetro (s) cúbico (s)

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

min - Minuto (s)

mm - Milímetro (s)

mm² - Milímetro (s) quadrado (s)

MMPs – metaloproteinases

TIMPs – inibidores de metaloproteinases

MPa - MegaPascal

mW/cm² - miliWatt (s) por centímetro (s) quadrado (s)

AM – Sistema adesivo Ambar

XP – Sistema adesivo XP Bond

p - significância

PVC - policloreto de vinila

RU - resistência de união

s - segundo (s)

SL - *smear layer*

UEPG - Universidade Estadual de Ponta Grossa

vs. - versus

TEGDMA - trietilenoglicidilmetacrilato

$\cong$ - aproximadamente

°C - graus Celsius

= - igual

$\pm$ - mais ou menos

> - maior

μ L - microlitro (s)

% - por cento

12M - doze meses

α - nível de significância

SO – sorção

SA – solubilidade

CHX - clorexidina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	22
2.	PROPOSIÇÃO	29
3.	MATERIAIS E MÉTODO	30
3.1	SISTEMAS ADESIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.1.1	EXPERIMENTO 1 e 2	32
3.1.2.	SELEÇÃO E PREPARO DOS DENTES	32
3.1.3.	PROCEDIMENTO ADESIVO	33
3.1.4.	PROCEDIMENTO RESTAURADOR	33
3.1.5.	PREPARO DOS CORPOS DE PROVA	34
3.1.6.	ENSAIO DE MICROTRAÇÃO	35
3.1.7.	ANÁLISE DO PADRÃO DE NANOINFILTRAÇÃO POR MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)	37
3.1.8.	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS NA INTERFACE DE UNIÃO RESINA-DENTINA POR MEIO DA TÉCNICA DE NANOINDENTAÇÃO	42
3.1.9.	TÉCNICA DA NANOINDENTAÇÃO	44
3.1.10.	NANODUREZA	46
3.1.11.	MÓDULO DE ELASTICIDADE	48
3.1.12.	NANOINFILTRAÇÃO	49
3.1.13.	ANÁLISE DOS DADOS DOS EXPERIMENTOS 1 E 2	49
3.2.	EXPERIMENTO 3	50
3.2.1.	PREPARO DOS ESPÉCIMES DE SORÇÃO, SOLUBILIDADE E LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA	50

3.2.2.	TESTE DE SORÇÃO E SOLUBILIDADE	50
3.2.3.	LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA	55
3.2.4.	ANÁLISE DE DADOS DO EXPERIMENTO 3	59
4.	DISCUSSÃO GERAL	60
5.	CONCLUSÃO	68
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
7.	ANEXO A	76

1- INTRODUÇÃO GERAL

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”, devem apresentar um comportamento clínico aceitável não só no tempo imediato, mas também ao longo do tempo. Para que este comportamento possa ser alcançado, faz-se necessária a obtenção e manutenção de uma adequada união da restauração à estrutura dental. Apesar da evolução dos sistemas adesivos nas últimas décadas, não se conseguiu ainda um resultado tão eficaz para a dentina quanto se tem quando se unem materiais adesivos, principalmente em longo prazo (Carvalho, 1 1998), o que torna a adesão a esse substrato um grande desafio aos pesquisadores.

Os sistemas adesivos sofreram inúmeras modificações e podem ser classificados atualmente em convencionais e autocondicionantes. Os adesivos convencionais necessitam do passo do condicionamento ácido separadamente, normalmente feito com ácido fosfórico em diferentes concentrações, sendo a mais comum 37%. O condicionamento tem a função de remover a *smear layer* (SL) ou lama dentinária proveniente dos restos do preparo cavitário, abrindo os túbulos dentinários para a penetração dos monômeros resinosos. Os adesivos autocondicionantes não necessitam da aplicação do ácido isoladamente, pois possuem em sua formulação, monômeros resinosos acídicos que desmineralizam e infiltram os tecidos dentais ao mesmo tempo (Van Meerbeek et al. 2 2003, Carvalho et al. 3 2004).

Aos poucos, a preocupação com a investigação dos motivos da degradação das estruturas tem sido incorporada entre os pesquisadores da área odontológica (Santerre et al. 4 2001), e a expectativa é que pesquisas futuras possam ser focadas na caracterização dos mecanismos responsáveis pela degradação das restaurações adesivas. Evidências científicas permitem especular que o comprometimento da interface adesiva dentina/resina composta é provavelmente o resultado de um efeito combinado da degradação de seus componentes resinosos que gradualmente absorvem água, tornando-se cada vez mais permeáveis e susceptíveis à hidrólise, e da degradação do substrato dentinário desmineralizado exposto, não protegido pela resina, que também está sujeito à hidrólise (Carrilho et al. 5 2005).

A queda nos valores de resistência mecânica da interface de união, após seu envelhecimento em água, tem sido atribuída à degradação das estruturas protéica e polimérica que a compõem, quais sejam as fibrilas de colágeno e a resina adesiva, respectivamente (Burrow et al. 6 1996). Estas especulações são apoiadas por estudos longitudinais de micromorfologia que revelam aumento do número e do diâmetro dos poros presentes na camada híbrida e na camada de adesivo, tanto de sistemas que preconizam o condicionamento ácido total quanto de autocondicionantes, e alertam para a possível fragilidade da interface de união quando submetido às condições que mimetizam o ambiente bucal (Hashimoto et al. 7 2003, Tay et al. 8 2003).

O efeito da água na estrutura dos materiais é usualmente estudado em função de seu reconhecido potencial degradante (Santerre et al. 4 2001). A água pode participar ativamente na clivagem das ligações poliméricas, como também server de meio para a ação de enzimas. No caso dos sistemas adesivos, que são constituídos

predominantemente por monômeros derivados da esterificação do ácido metacrílico, este efeito se torna ainda mais marcante, devido à suscetibilidade das ligações do tipo éster à clivagem por hidrólise (Göpferich 9 1996). Adicionalmente, o caráter hidrófilo dos ésteres de metacrilato pode aumentar a permeação de água através do polímero formado (Tay et al. 10 2003, Chersoniet al. 11 2004), acelerando os processos de cisão das cadeias poliméricas e de erosão dos produtos da degradação, fato que justificaria o aumento das porosidades observadas nas micrografias da união adesiva, realizadas após armazenagem prolongada em meio aquoso (Tay & Pashley, 12 2003).

Outro mecanismo de degradação é mais recente e tem sido sustentado por alguns recentes estudos *in vitro* e *in vivo* (Hebling et al. 13 2005, Mazzoni et al. 14 2006, Carrilho et al. 15 2007). Estes estudos indicam que, quando realizamos o condicionamento ácido, tanto o colágeno como proteínas não-colanogênicas podem ser expostas. A seguir ocorre uma ação proteolítica dos componentes da própria matriz de dentina desmineralizada ou da dentina adjacente à camada híbrida através, por exemplo, da proteólise do colágeno devido à re-ativação das metaloproteases da matriz (MMPs), enzimas não-colagênicas que constituem parte da matriz extracelular da dentina (Hebling et al. 13 2005, Mazzoni et al. 14 20, Carrilho et al. 15 2007, Breschi et al. 16 2007). Em especial pelo fato de que os adesivos dentinários atuais, os autocondicionantes que simultaneamente condicionam e infiltram, não conseguem recobrir totalmente as fibras colágenas expostas após o processo de desmineralização (Carvalho et al. 17 2005), tornando-as susceptíveis à degradação frente aos fluidos presentes na estrutura dental (Hashimoto et al. 18 2003, Wang & Spencer 19 2003).

Desta maneira, há suspeita de que as MMPs expostas possam de alguma forma participar da degradação do colágeno exposto durante o procedimento adesivo, mesmo na ausência de bactérias, através de um mecanismo proteolítico endógeno. Estas hipóteses têm sido confirmadas por estudos laboratoriais e clínicos (Hashimoto et al. 7 2003, Pashley et al. 20 2004, Hebling et al. 13 2005, Armstrong et al. 21 2006, Mazzoni et al. 14 2006, Nishitani et al. 22 2006, Carrilho et al. 15 2007).

As metaloproteases da matriz (MMPs) constituem um grupo de mais de vinte enzimas conhecidas como endopeptidases presentes na matriz extracelular dos tecidos dos mamíferos, e que separadamente ou em conjunto quebram muitos senão todos os constituintes da matriz extracelular (Birkedal-Hansen et al. 23 1993, Clark et al. 24 2008), em especial quando se observa intensa atividade metabólica de remodelação e degradação de vários tipos de colágeno. Algumas MMPs se envolvem na amelogênese e dentinogênese e sabe-se que essas enzimas podem permanecer inativas na matriz extracelular do esmalte e dentina após o processo de mineralização dos mesmos (Van Strijp et al. 25 2003, Chaussain-Miller et al. 26 2006).

Sendo assim, é de fundamental importância a inclusão de inibidores de MMPs a fim de diminuir a degradação das interfaces adesivas. Vários são os inibidores de MMPs descritos na literatura e eles podem ser divididos em endógenos e exógenos. Os inibidores teciduais (endógenos) das metaloproteases de matriz (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 (Chaussain-Miller et al. 26 2006, Sorsa et al. 27 2006). Contudo, com os resultados dos estudos descritos anteriormente (Hashimoto et

al. 7 2003, Hebling et al. 13 2005, Mazzoni et al. 14 2006, Carrilho et al. 15 2007, Pashley et al. 20 2004, Armstrong et al. 21 2006, Nishitani et al. 22 2006) pode-se indicar que, os TIMPs não tem sido capazes de inibir o processo proteolítico que ocorre nas interfaces de união resina-dentina. Sendo assim, a literatura tem proposto diversos inibidores exógenos, tais como a clorexidina, substâncias a base de tetraciclina, (Osorio et al. 29 2011) ou mesmo inibidores específicos tais como SB3CT (De Munck et al. 30 2009) e galardim (Breschi et al. 31 2010) .

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. 31 1989). Este composto é efetivo na inibição de pelo menos três tipos de metaloproteases MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (Gendron et al. 33 1999), as mais associadas ao processo de degradação da interface adesiva (Mazzoni et al. 14 2006; Nishitani et al. 22 2006). Os autores acreditam que o efeito inibitório da clorexidina sobre essas metaloproteases se deve a uma sua substantividade tanto ao tecido mineralizado quanto desmineralizado (Carrilho et al. 34 2010). 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 (de Castro et al. 35 2004, Hebling et al. 13 2005).

Estudos laboratoriais e clínicos têm demonstrado que o uso de solução aquosa de clorexidina a 2% por 60s após o condicionamento ácido e previamente a aplicação de adesivos que utilizam o condicionamento ácido (convencionais simplificados),

diminuiu a degradação de interfaces adesivas expostas em água ao longo do tempo (Hebling et al. 13 2005, Carrilho et al. 15,37 2007).

Outro estudo recente (Stanislawczuk et al. 37 2009, Stanislawczuk et al. 38 2011) avaliou o efeito da aplicação de clorexidina a 2 % adicionada no condicionamento ácido na resistência de união imediata, após 6 meses e 2 anos de armazenagem em água. Os autores demonstraram que o uso de ácido contendo CHX ajuda da mesma forma que a aplicação da CHX após o condicionamento ácido, ou seja, preservando a degradação da interface dentinária ao longo do tempo.

Dentro desta mesma temática, mais recentemente, estudos tem proposto a inclusão de CHX em sistemas adesivos autocondicionantes (Zhou et al. 39 2009, Zhou et al. 40 2011, De Munck et al. 41 2010, De Munck et al. 42 2010) assim como já realizado para outros materiais restauradores, seja em resinas compostas ou ionômeros de vidro (Riggs et al. 43 2000, Palmer et al. 44 2004, Leung et al. 45 2005, Anusavice et al. 46 2006).

Nestes casos específicos a idéia é também a de melhorar as propriedades antibacterianas destes materiais através da doação da clorexidina ao longo do tempo. Nos parece mais ágil e menos complicado a alternativa de já contar com um inibidor de MMPs incorporado ao adesivo.

Outro estudo (Hiraishi et al. 47 2008) avaliou o efeito da adição de 1 e 5% de clorexidina na sorção de água e solubilidade de sistemas adesivos experimentais além das propriedades antimicrobianas os resultados demonstraram que não houve nenhum efeito antimicrobiano associado a CHX. Além disso, demonstrou que maiores concentrações de CHX podem afetar a sorção e solubilidade destes materiais, assim

como também demonstrado para outras propriedades mecânicas (Cadernaro et al. 48 2009). Isto deixa claro que a concentração de CHX a ser adicionada nas misturas adesivas tem papel fundamental nas propriedades da interface de união. Apenas um grupo de pesquisadores avaliou o efeito da inclusão de diferentes concentrações de CHX em sistemas adesivos (Zhou et al. 39 2009, Zhou et al. 40 2010). Entretanto a CHX foi incluída em um adesivo autocondicionante de 2 passos. O mais relevante é que a CHX usada foi o digluconato de CHX, forma da CHX que carrega na sua composição grande quantidade de água, o que pode alterar as propriedades do material. Nestes casos a CHX foi incluída em sistemas adesivos experimentais com diferentes graus de hidrofília, mas sem a presença de solventes, a concentração de clorexidina foi maior em adesivos mais hidrófilos, sendo esta correlacionada com a sorção de água da película adesiva. Isto é um indicativo de que a adição de clorexidina possa ser uma alternativa altamente segura.

2- PROPOSIÇÃO

1- Avaliar se a adição de diferentes concentrações de clorexidina (0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,2%) em dois sistemas adesivos convencionais de dois passos (Ambar e XP Bond) podem afetar as propriedades adesivas imediatas (resistência de união, nanoinfiltração, nanodureza e módulo de elasticidade da camada híbrida e camada adesiva).

2- Avaliar se a adição de diferentes concentrações de clorexidina (0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,2%) em dois sistemas adesivos convencionais de dois passos (Ambar e XP Bond) podem afetar as propriedades adesivas (resistência de união, nanoinfiltração) e ao longo do tempo.

3- Avaliar se a adição de diferentes concentrações de clorexidina (0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,2%) em dois sistemas adesivos convencionais de dois passos (Ambar e XP Bond) podem afetar a sorção, a solubilidade e a liberação de clorexidina ao longo do tempo.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 SISTEMAS ADESIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram selecionados para este estudo dois sistemas adesivos experimentais sendo eles: Ambar [AM] (FGM Prod. Odont., Ltda, Joinville, SC, Brasil) com solvente a base de água e etanol e XP Bond [XP], (Dentsply, York, PA, E.U.A.) com solvente a base de álcool tert-butanol. Os dois sistemas adesivos selecionados sofreram acréscimo em sua fórmula original de diacetato de clorexidina (99% pura; SIGMA, St. Louis, MO, E.U.A.) em diferentes concentrações (0,01%; 0,05%, 0,1% e 0,2%) em peso. Esses adesivos são convencionais de dois passos, ou seja, preconizam a técnica de condicionamento ácido previamente a aplicação do adesivo e se apresentam em um único frasco. O estudo é dividido em três etapas a seguir: 1º) avaliação imediata das propriedades adesivas, resistência de união, nanoinfiltração, nanodureza e módulo de elasticidade – Diagrama 1; 2º) avaliação ao longo do tempo (12 meses) da resistência de união e nanoinfiltração - Diagrama 2; 3º) avaliação da sorção e solubilidade, bem como da liberação clorexidina imediata e após 28 dias - Diagrama 3. O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob o número de parecer 24 / 2010 e protocolo número 16963 / 09 (Anexo A).

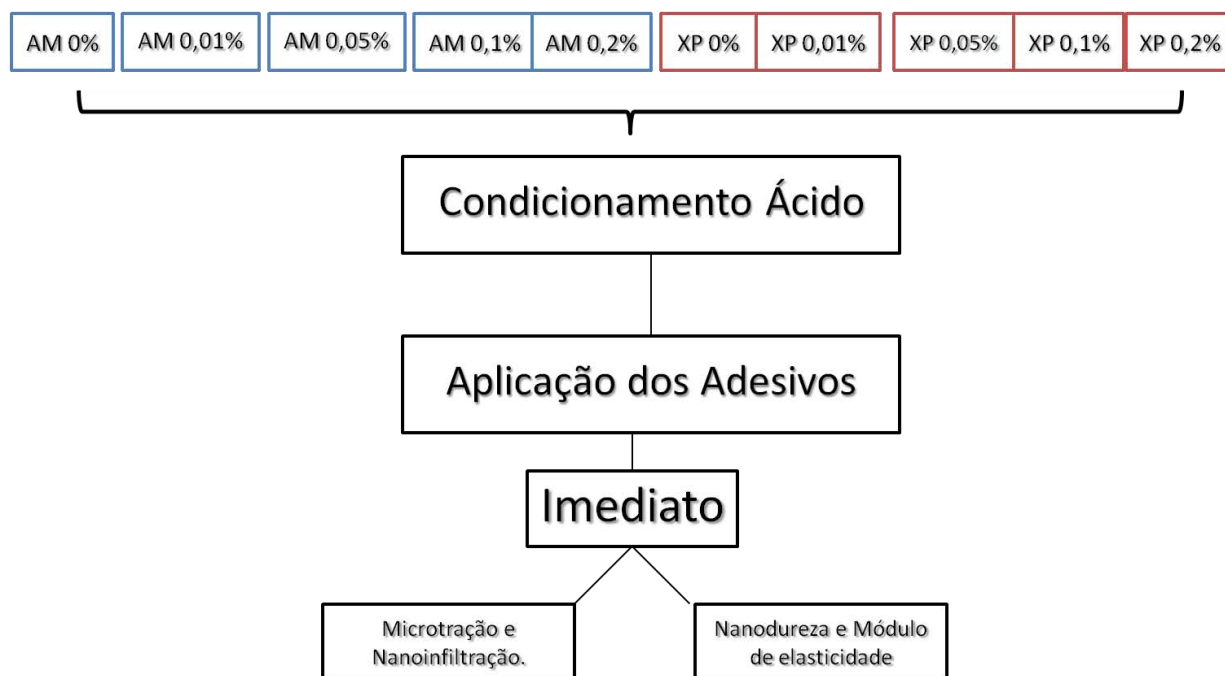


Diagrama 1 – Desenho experimental do estudo 1.

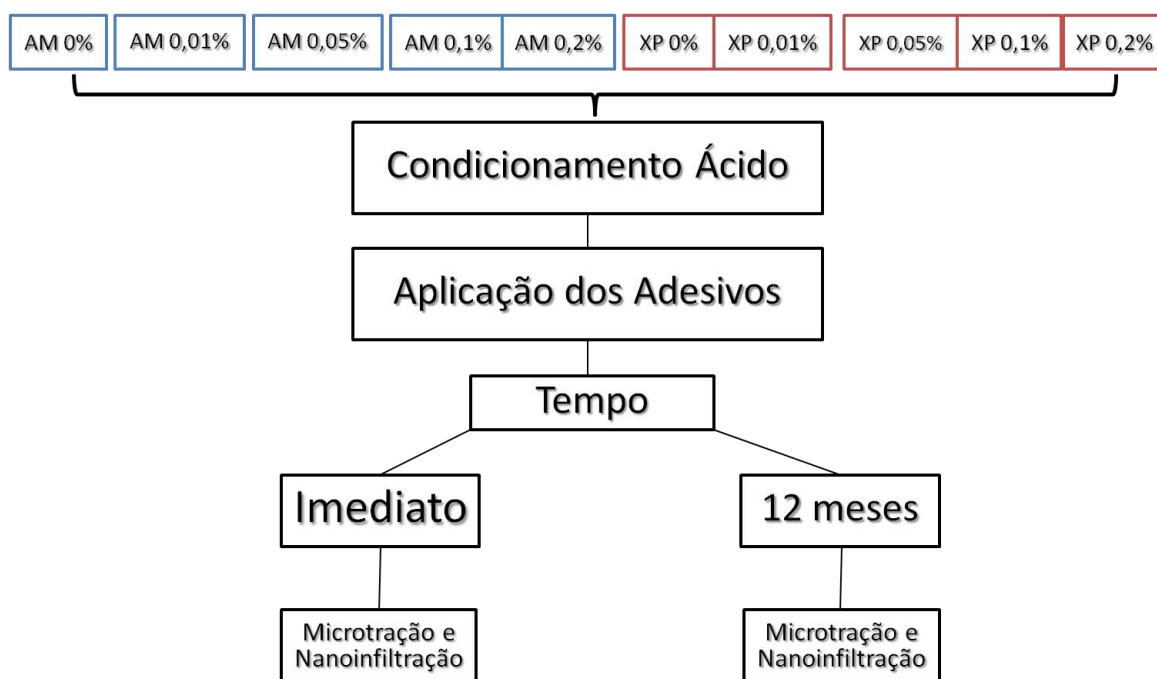


Diagrama 2 – Desenho experimental do estudo 2.

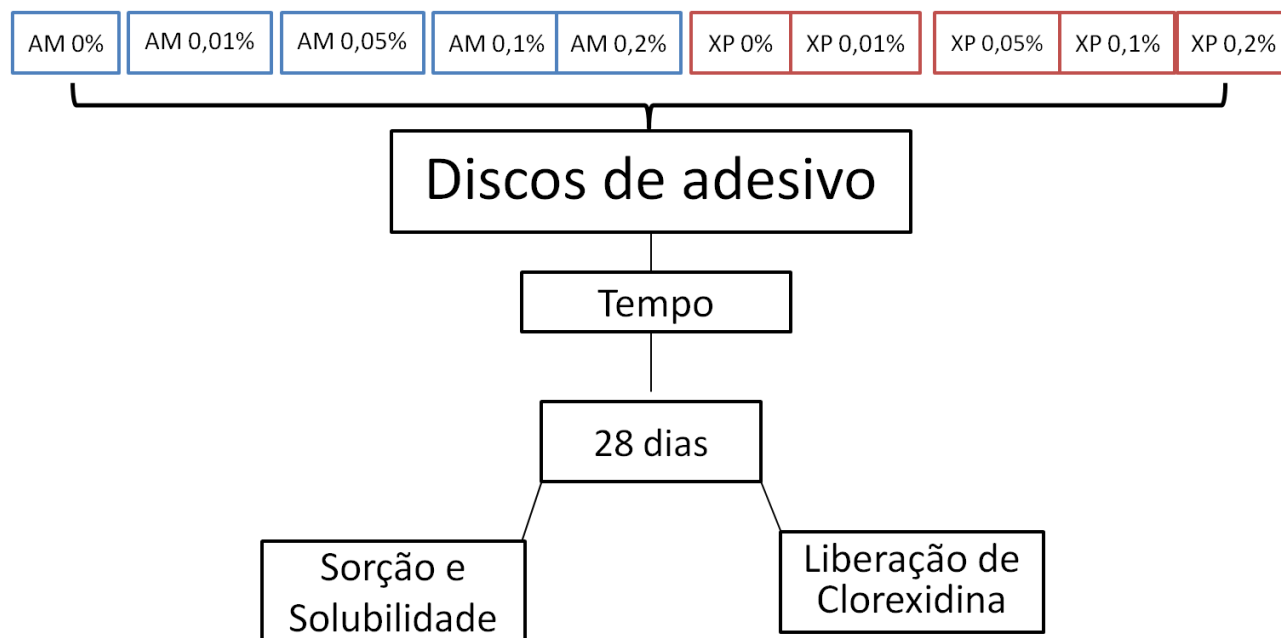


Diagrama 3 – Desenho experimental do estudo 3.

3.1.1 EXPERIMENTO 1 e 2

3.1.2 SELEÇÃO E PREPARO DOS DENTES

Foram utilizados 150 terceiros molares humanos, hígidos, extraídos por indicação odontológica, armazenados em solução de cloramina a 0,5% por 24 horas e posteriormente em água destilada. 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 (figura 1). Os dentes foram divididos em 10 condições experimentais por adesivo, perfazendo um total de 10 dentes para cada condição experimental sendo 5 dentes para análise por microtração; 3 para nanodureza e módulo de elasticidade e 2 dentes submetidos a análise do padrão de nanoinfiltração

para o experimento 1 e 5 dentes para análise por microtração e padrão de nanoinfiltração para cada condição experimental no experimento 2.

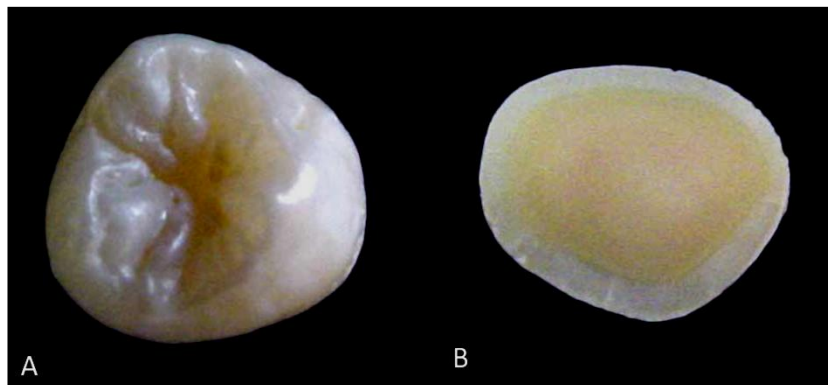


Figura 1 – A) Imagens dos dentes intactos e B) com a oclusal desgastada.

3.1.3 PROCEDIMENTO ADESIVO

As superfícies dentinárias foram condicionadas por 15 segundos, seguido de lavagem com jatos de água/ar pelo dobro do tempo. Os sistemas adesivos foram aplicados em dentina levemente úmida. Foram aplicadas duas camadas de adesivo com um *microbrush* e pressão digital por 10 s, intercalados com jatos de ar (10s a 20 cm de distância) para a evaporação do solvente e água residual. Por fim, o adesivo foi fotoativado por 10 s com um aparelho de luz halógena (VIP (Bisco, Schaumburg, IL, E.U.A.) calibrado em 600 mW/cm²; aferida pelo próprio radiômetro do aparelho.

3.1.4 PROCEDIMENTO RESTAURADOR

Após o procedimento adesivo, foram confeccionadas restaurações de resina composta Opallis (FGM, Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil) com 3,0 mm de altura, em três porções. Cada uma das porções foi fotoativada por 40 s com potência de 600mW/cm² (Figura 2 e 3). Na seqüência, 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. 49 2001).



Figura 2 – A) Condicionamento ácido realizado; B) aplicação do adesivo e C) confecção dos incrementos de resina composta.



Figura 3 – Fotoativação dos incrementos de resina composta com aparelho fotoativador.

3.1.5 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA

Após restaurados, os dentes foram fixados com cera pegajosa a um dispositivo a ser fixado em uma máquina de corte de tecidos duros (Labcut 1010 Extec Corp., Enfield, CT, E.U.A.) com a interface de união perpendicular ao disco de corte (Figura 4). 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 corpos de prova (CPS) provenientes do teto da câmara pulpar para verificar a profundidade em dentina. Para o experimento 1 todos os CPS obtidos foram testados imediatamente e para o experimento 2, apenas parte foi testada no tempo imediato (microtração e nanoinfiltração), sendo o restante testado após 12 meses de armazenagem em água destilada a 37°C.



Figura 4 – Corpo de prova (CP) fixado no anel que se acopla à máquina de corte.

3.1.6 ENSAIO DE MICROTRAÇÃO

Cada CP foi fixado com cola de cianocrilato (Super-Bonder Gel, Loctite, São Paulo, SP, Brasil) a uma garra desenvolvida para os ensaios de microtração (Odeme Prod. Med. Odont., Joaçaba, SC, Brasil) que foi acoplada à máquina de ensaios (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil), 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 CPS 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 (HNV-2, Shimadzu, Toquio, Japão) e classificada nos seguintes padrões: 1) coesiva de dentina; 2) coesiva de resina composta; 3) adesiva/mista na interface (Figuras 5, 6 e 7).

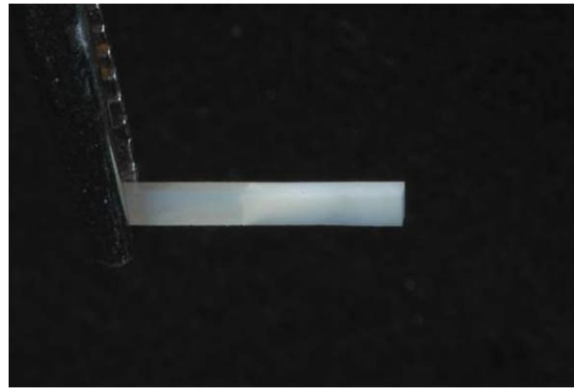


Figura 5 – Corpo de prova cortado longitudinal e transversalmente.

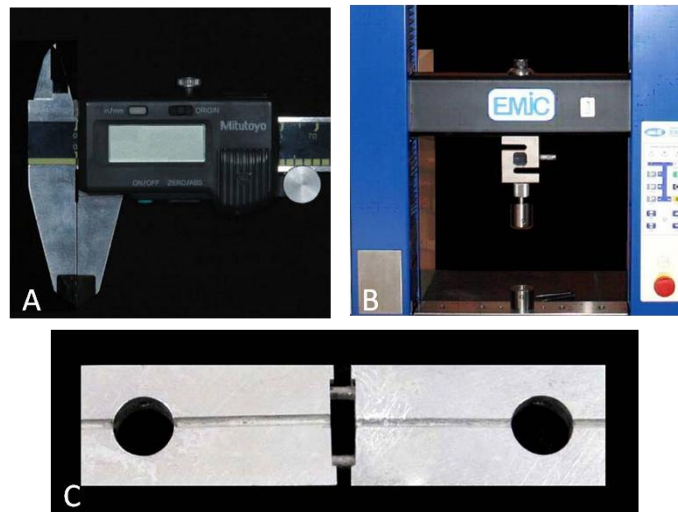


Figura 6 – A) paquímetro digital para a medição da área dos cp B) máquina utilizada para o teste de microtração e C) garra para o teste de microtração.



Figura 7 – Corpo de prova colado ao dispositivo para realização de microtração.

3.1.7 ANÁLISE DO PADRÃO DE NANOINFILTRAÇÃO POR MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)

Para análise microscópica das interfaces, 2 dentes de cada situação experimental (experimento 1) e 2 palitos por condição experimental (Adesivo e Tempo) para o experimento 2 foram submetidos à mesma metodologia empregada para a obtenção dos cp utilizados no teste de microtração sendo que os espécimes armazenados para longevidade serão avaliados no experimento 2. Um total aproximado de 10 CPS por dente foi selecionado aleatoriamente e levado para análise em MEV. Os CPS foram previamente isolados com esmalte para que apenas a interface dente-restauração ficasse exposta ao agente infiltrante. Em seguida foram imersos em nitrato de prata amoniacal e mantidos em ambiente escuro por 24 h. Após a infiltração pelo nitrato de prata, os CPS foram cuidadosamente lavados com água destilada, secos com papel absorvente e imersos em uma solução evidenciadora por 8 h sob uma luz fluorescente para que a redução dos íons de prata dentro da interface de união fosse possível (Figura 8).



Figura 8 – A) cp confeccionado; B) cp isolado com esmalte (apenas a interface dente/restauração exposta) e C) cp infiltrado com nitrato de prata.

O próximo passo foi o embutimento dos CPS em resina acrílica incolor da marca Clássico (São Paulo, SP, Brasil). Sob uma placa de vidro foi posicionada fita adesiva dupla face para que fossem posicionados os CPS paralelamente uns aos outros. Envolvendo estes cp uma matriz de policloreto de vinila (PVC) de 1 cm de altura e 2 cm de diâmetro (Figura 9) devidamente isolada com vaselina foi posicionada sobre a placa de vidro e dentro desta matriz foi acomodada à resina acrílica incolor (Figura 10).



Figura 9 – Matriz de PVC confeccionada para o embutimento dos cp (dimensões: 2 cm de diâmetro e 1 cm de altura).

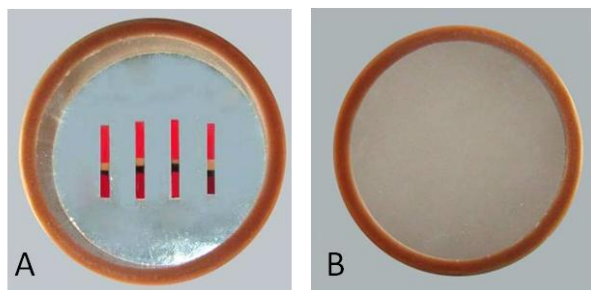


Figura 10 – A) cp fixados na fita dupla face, envoltos pela matriz previamente isolada; B) resina acrílica incolor sobre os CPS.

Após o término da reação de polimerização da resina acrílica, as amostras foram então submetidas ao polimento com a utilização de lixas e pastas diamantadas. Empregaram-se respectivamente lixas de granulação 600, 1200, 2400 e as pastas diamantadas Arotec (São Paulo, SP, Brasil) com granulação decrescente ($1\ \mu\text{m}$, $\frac{1}{4}\ \mu\text{m}$ e $0,05\ \mu\text{m}$), o polimento foi realizado sempre no mesmo sentido durante 3 min em cada lixa e cada pasta (Figura 11). Intercalando cada agente de polimento as amostras receberam banhos com água destilada por 3 min em cuba ultra-sônica Dabi Atlante - 3L (Ribeirão Preto, SP, Brasil) para a remoção de possíveis resíduos resultantes do polimento (Figura 12). Alguns outros cuidados também foram tomados para evitar que a imagem posteriormente obtida pudesse ser comprometida:

- Observação em microscópio óptico após a utilização de cada lixa e pasta de polimento, evitando assim riscos profundos e falhas;
- troca da água destilada para cada banho ultra-sônico realizado em cada amostra e;
- troca das luvas entre os diferentes agentes de polimento, para que resíduos não contaminassem a amostra.



Figura 11 – Seqüência de pastas diamantadas utilizadas no polimento das amostras, granulação decrescente 1 µm (rosa), 1/4 µm (roxa) e 0,05 µm (verde).



Figura 12 – Cuba ultra-sônica utilizada nos banhos entre os agentes polidores.

Os CPS foram em seguida desmineralizados em uma solução de ácido fosfórico a 50% por 3 s para desmineralização superficial, lavados com água destilada por 20 s e imersos durante 10 min em hipoclorito de sódio a 1% para desproteinização superficial. As amostras contendo os CPS embutidos foram colocadas em um recipiente hermeticamente fechado, contendo sílica desidratada (de cor azulada) (Figura 13), para evitar exposição à umidade. Estes recipientes contendo as amostras foram mantidos por 24 h em temperatura ambiente, em seguida foram levadas para o dessecador igualmente em temperatura ambiente por 24 h e finalmente foram levadas a estufa a 40°C pelo mesmo tempo. Os procedimentos de desidratação foram realizados visando

à remoção completa da umidade residual existentes nos CPS, para evitar formação de fendas na interface de união em função do vácuo inerente ao método da microscopia eletrônica de varredura.

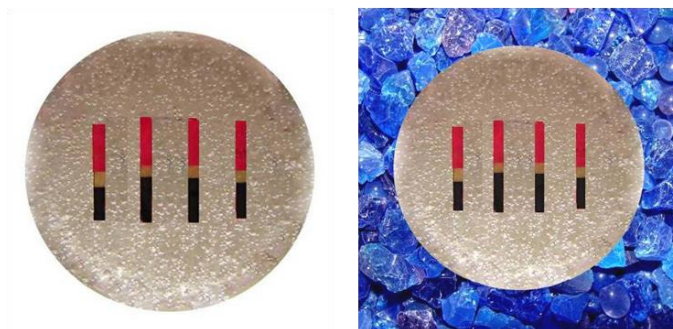


Figura 13 – A) amostras polidas; B) amostras já desmineralizadas dentro de um recipiente contendo sílica desidratada (azul).

As amostras já polidas e desidratadas foram então metalizadas para que as imagens em microscopia eletrônica pudessem ser obtidas. A metalização ocorre dentro de uma câmara a vácuo que possui um alvo de ouro (Figura 14). Em seguida as interfaces de união foram avaliadas em MEV (Figura 15).



Figura 14 – Metalizador para as amostras do MEV o detalhe à esquerda mostra o equipamento em funcionamento.



Figura 15 – Microscópio Eletrônico de Varredura.

Para se determinar a quantidade de nitrato de prata presente nas interfaces dentina resina um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo operada no modo de elétrons retroespalhados e uso de energia dispersiva de raios-X espectrometria foi usado (EDX) (LEO 435 VP, LEO microscopia eletrônica Ltd., Cambridge, UK). A quantidade de absorção de nitrato de prata dentro da camada adesiva, em cada palito, foi medido com EDX em três regiões ($5 \times 5 \mu\text{m}$) da região da interface (esquerda, central e direita) (Reis et al. 50 2007). O comprimento total da camada híbrida digitalizado para essa medição foi cerca de 75 mm^2 . A absorção de nitrato de prata foi expressa como uma percentagem da área total avaliada.

3.1.8 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS NA INTERFACE DE UNIÃO RESINA-DENTINA POR MEIO DA TÉCNICA DE NANOINDENTAÇÃO

Consiste em estimar as propriedades elásticas e plásticas da interface de união resina-dentina, formada por diferentes condições experimentais. Todos os experimentos de nanoindentação para obtenção das grandezas dureza e módulo de elasticidade das amostras em estudo neste trabalho foram realizados usando um Nano

Indenter® XP (MTS®, MN, EUA) mostrado na Figura 16, localizado no Laboratório de Propriedades Nanomecânicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).



Figura 16- Vista do nanoidentador composto pela cabine isoladora e pelo conjunto de programação e controle formado pela estação de trabalho com seus periféricos: dois monitores de imagens e uma impressora.

Dos dez dentes por condição experimental, três deles foram reservados para análise de nanodureza e módulo de elasticidade. Os palitos já cortados, exatamente como descritos para ensaio de microtração, foram fixados com auxílio de uma parafina em um “porta-amstras” de 33 mm de diâmetro e 22 mm de altura, para facilitar o manuseio durante o polimento metalográfico. Inicialmente as amostras foram submetidas a lixas de carbeto de silício com granulometrias 600, 1000, 1200, 1500, 2000 e 4000 (Figura 16). Posteriormente, foram utilizados discos de feltro macios com pasta diamantada, com tamanho de partícula de 1 e 1/4 μm , em uma máquina politriz Aropol S (Arotec, Cotia, SP, Brasil) em 300 rpm (Figura 17), produzindo superfícies lisas necessárias para os experimentos de nanoindentação. Entre cada passo e após o término do polimento, as amostras foram ultrassonicamente lavadas em água destilada por 12 min para limpeza do material removido da matriz. Após estocagem em água à

37°C por 24 h, os espécimes foram submetidos ao teste de nanoindentação. A microscopia óptica foi utilizada com o microscópio OLYMPUS – BX 51 (Olympus, Tóquio, Japão) para análise da superfície das amostras durante o polimento metalográfico (Figura 18).

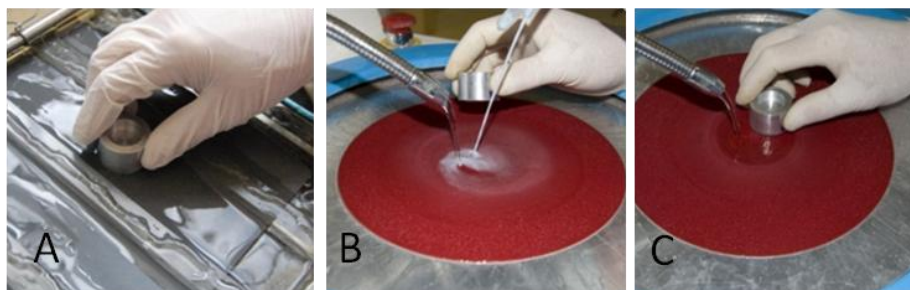


Figura 17 – Polimento metalográfico. A) polimento da amostra com lixas de decrescentes abrasividades. B) e C) polimento das amostras com disco de feltro e pasta diamantada.

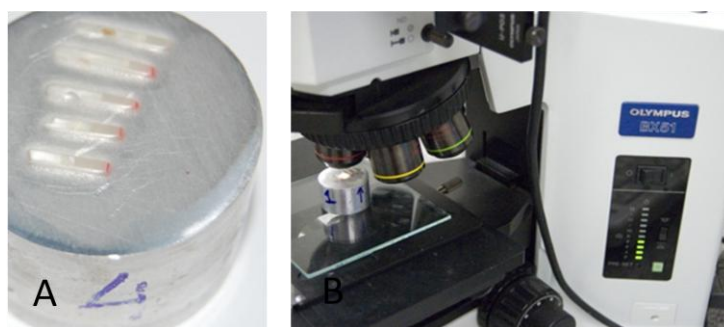


Figura 18- A) porta-amostra com palitos polidos. B) observação em microscópio óptico das superfícies devidamente polidas necessárias para o experimento de nanoindentação.

3.1.9 TÉCNICA DA NANOINDENTAÇÃO

A técnica de nanoindentação consiste em fazer penetrar uma ponta de diamante no material, controlando e registrando a carga e a profundidade de penetração, a qual é feita em escala nanométrica. As cargas utilizadas foram pré-selecionadas em 0,1 ou 5 grama-força (gf) dependendo da região indentada e aplicadas em um único ciclo de

carregamento-descarregamento (Higashi et al. 51 2009). Os testes foram realizados em atmosfera e temperatura ambientes (24°C), utilizando uma ponta de diamante piramidal de base triangular denominada Berkovich (Figura 19), em amostras que foram mantidas secas no momento dos teste. As regiões sobre a amostra foram examinadas e selecionadas para indentação utilizando um microscópio ótico e uma mesa móvel (sistema X-Y), instalada dentro do dispositivo mostrado na Figura 19.

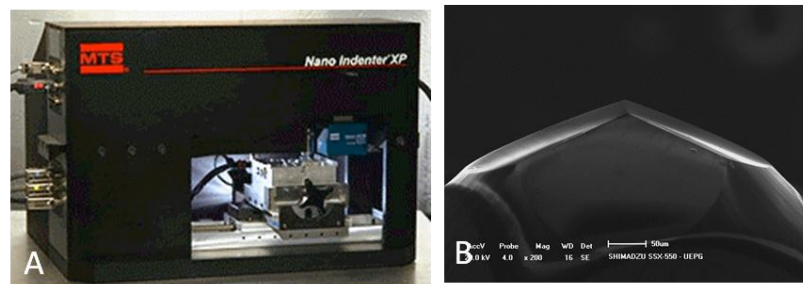


Figura 19 - A) vista mais aproximada do dispositivo de ensaios onde se realizam as nano-indentações; B) ponta de diamante piramidal de base triangular Berkovich.

Para a exata mensuração dos valores de dureza e módulo de elasticidade, a distância entre cada indentação deve ser de no mínimo cinco vezes o tamanho da deformação plástica formada por cada indentação (Urabe et al. 52 2000). Desta forma, na região R1 (resina composta) a carga utilizada foi de 5 gf e o interval entre cada indentação foi maior que 20 µm. Na região R2 (camada de adesivo dentinário) a carga utilizada foi de 5 gf, com intervalo de no mínimo 10 µm entre cada indentação. Na região R3 (camada híbrida) a carga utilizada foi de 0,1-0,2 gf e o intervalo entre cada indentação foi maior do que 3 µm. Na região R4 (dentina) a carga utilizada foi de 5 gf, com intervalo de no mínimo 20 µm entre cada indentação (3) (Figura 20).

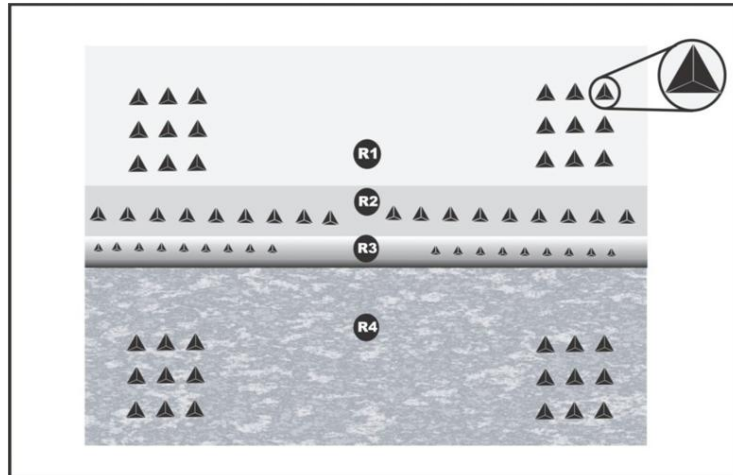


Figura 20 - Desenho esquemático mostrando as quatro regiões distintas contendo dois grupos de nove indentações para cada região: (R1) corresponde à resina composta, (R2) corresponde ao centro de massa relativa da espessura da camada de adesivo dentinário, (R3) na região superior da massa relativa da espessura da camada híbrida e (R4) corresponde à dentina.

A velocidade de aproximação do indentador em direção à superfície da amostra foi de 10 nm/s. Após o contato, o tempo utilizado durante o ciclo de indentação tanto para o carregamento quanto para o descarregamento foi de 5 s. Entre o ciclo de carregamento e de descarregamento a carga foi mantida constant por um período de 10 s.

3.1.10 NANODUREZA

Quando é realizada a nanoindentação a amostra sofre uma deformação elástica e plástica, sendo que os dados produzidos são colocados num diagrama força-deslocamento, o qual descreve uma curva denominada carga-descarga (Figura 21). Durante a indentação, a carga (P) e a profundidade de penetração (h) são registradas em função do tempo. A curva de carregamento refere-se à penetração do indentador na amostra até uma carga máxima pré-estabelecida e a curva de descarregamento se refere à remoção da carga e diminuição da profundidade de indentação em função do

tempo. Estas curvas fornecem as informações sobre o módulo de elasticidade das amostras.

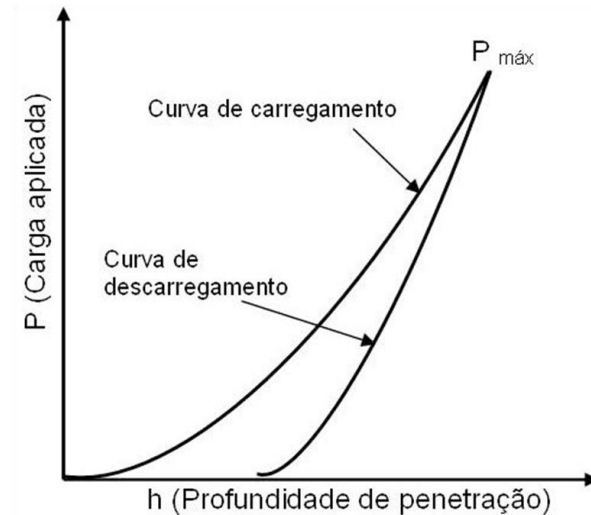


Figura 21- Representação esquemática da curva típica da carga aplicada (mN) versus profundidade de penetração (nm) realizada para cada indentação na amostra.

A nanodureza (H) é calculada como a pressão máxima que o material suporta sob carregamento, sendo calculada da seguinte expressão:

$$H = \frac{P_{\text{máx}}}{A} \quad (1)$$

onde, A é a área projetada do contato. Substituindo a equação 1, para um penetrador Berkovich ideal, em 2 leva a (Oliver and Phar 53 1992):

$$H = \frac{P_{\text{máx}}}{24,5h_c^2} \quad (2)$$

em que h_c é a profundidade de contato estabelecido entre a ponta Berkovich e a amostra. ((Oliver and Phar 53 1992; Brotzen 54 1994).

3.1.11 MÓDULO DE ELASTICIDADE

O cálculo do módulo de elasticidade foi obtido através das curvas geradas durante a indentação dos espécimes. A idéia básica é que, mesmo para materiais que exibem deformação plástica durante o carregamento, o início do descarregamento é elástico. O módulo de elasticidade reduzido do espécime pode ser determinado a partir da inclinação da curva de descarregamento. Uma equação foi derivada para o módulo de elasticidade reduzido, E_r ((Oliver and Pharr 1992)):

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi}}{2\beta} \frac{S_{max}}{\sqrt{A}} \quad (3)$$

onde β é uma constante que depende da geometria do penetrador. Onde S_{max} é igual a dP/dh , ou seja é a rigidez obtida experimentalmente da parte superior da curva de descarregamento. (A) é a área de contato projetada, P é a carga e h é o deslocamento do penetrador. E_r é o módulo de elasticidade reduzido, o qual inclui os efeitos de penetradores não rígidos, isto é, está relacionado com o módulo de elasticidade do espécime e do penetrador através da seguinte equação:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1-\nu_i^2}{E_i} + \frac{1-\nu^2}{E} \quad (4)$$

onde E_i e ν_i são o módulo de elasticidade e a coeficiente de *Poisson* do material do indentador e E e ν são o módulo de elasticidade e a coeficiente de *Poisson* do material penetrado.

3.1.12 NANOINFILTRAÇÃO

As amostras já polidas e desidratadas foram então metalizadas para que as imagens em microscopia eletrônica pudessem ser obtidas. A metalização ocorre dentro de um câmara a vácuo que possui um alvo de ouro (Figura 14). Em seguida as interfaces de união foram avaliadas em MEV (Figura 15).

Para análise da superfície das amostras durante o polimento metalográfico e para identificação das indentações realizadas nas regiões R1, R2 e R4 (Figura 20). As indentações realizadas na região R3 foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, devido à utilização de cargas muito pequenas durante os ensaios mecânicos e por serem regiões de dimensões micrométricas.

3.1.13 ANÁLISE DE DADOS DOS EXPERIMENTOS 1 E 2

No experiment 1 foi realizada a media de todos os valores obtidos no mesmo dente para a resistência de união, nanoinfiltração, nanoindentação e módulo de elasticidade. Os espécimes com falhas coesivas e prematuras não foram incluídos na média das resistência de união. Para cada propriedade, os dados de cada adesivo foram submetidos a uma análise de um fator de variância (concentração de clorexidina) e ao teste de Tukey para contraste das médias ($\alpha = 0,05$). No caso da nanoindentação e módulo de elasticidade foi calculado uma média para todos os espécimes de resina composta e dentina mineralizada e esta foi utilizada apenas para comparação.

No experimento 2 foi novamente realizada a média de todos os valores obtidos no mesmo hemi-dente para a resistência de união e nanoinfiltração. Os espécimes com falhas coesivas e prematuras não foram incluídos na média de resistência de união de cada hemi-dente. Para cada propriedade, os dados de cada adesivo foram submetidos a uma análise de variância de mediadas repetidas de 2 fatores (concentração de clorexidina e tempo) e ao teste de Tukey para o contraste das médias ($\alpha = 0,05$). O hemi-dente foi considerado a medida repetida.

3.2. EXPERIMENTO 3

3.2.1. PREPARO DOS EPÉCIES E SORÇÃO E SOLUBILIDADE

Foi adicionado diacetado de clorexidina (99% pura; SIGMA, St. Louis, MO, E.U.A.) nas concentrações 0.01%; 0.05%; 0.1% e 0.2% em peso nos adesivos convencionais simplificados XP Bond, (XP) (Dentsply, York, PA, E.U.A.) e Ambar, (AM) (FGM Prod. Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) assim como demonstrado no experimento 1.

3.2.2. TESTE DE SORÇÃO E SOLUBILIDADE

Foi utilizada uma matriz metálica cilíndrica (5,0 mm de diâmetro, 1,0 mm de espessura; Odeme Prod Odont Ltda, Joaçaba, SC, Brasil) para a confecção dos corpos de prova (CPS). Foram confeccionados dez CPS por condição experimental. Aplicou-se vaselina na base da matriz, em seguida, uma matriz de poliéster foi colocada em contato com a base da matriz (Figura 22).



Figura 22 - A) matriz utilizada para confecção dos corpos de prova; B) aplicação de vaselina; C) colocação de uma tira de poliéster na base da matriz metálica.

Removeu-se o excesso de vaselina sobre a matriz (Figura 23) e depois do deslocamento da matriz para cada condição experimental o adesivo foi gotejado dentro da matriz até o completo preenchimento (Figura 23). Todas as bolhas de ar visíveis dos adesivos foram cuidadosamente retiradas com auxílio de um microaplicador (Microbrush® FGM, Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brasil). A evaporação do solvente foi realizada com um jato de ar por 40 s a uma distância de 10 cm.

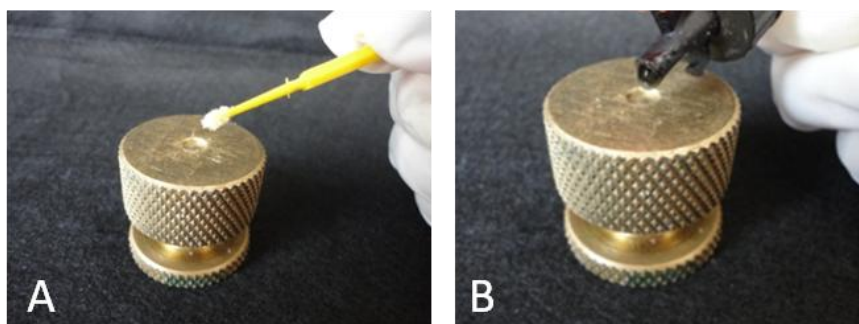


Figura 23 – A) remoção do excesso de vaselina; B) gotejamento do adesivo.

Outra tira de poliéster foi colocada sobre a matriz (Figura 24) e os adesivos foram ativados por 40 s com o fotopolimerizador a base de LED Rádii-cal (SDI, Bayswater, Victoria, Austrália) com uma intensidade de luz de 1200 mW/cm^2 (Figura 24).

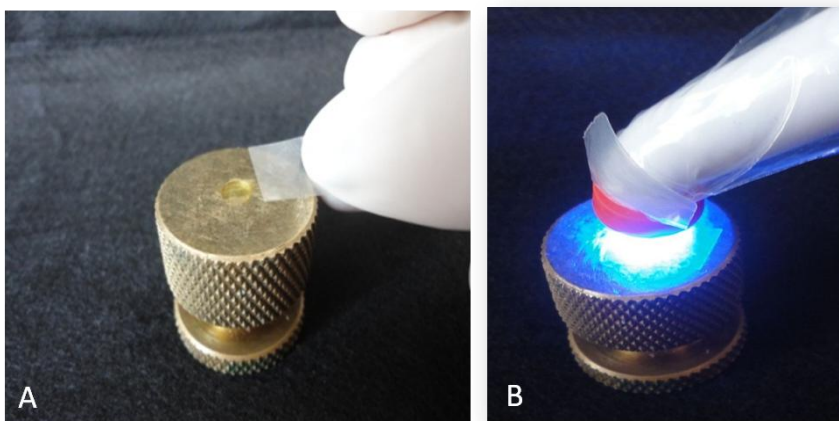


Figura 24 - A) colocação da tira de poliéster; B) fotoativação dos espécimes.

Os espécimes foram removidos cuidadosamente da matriz com o auxílio de uma lâmina de bisturi sendo também removidas todas as rebarbas de adesivo. Os CPS permitiram sua remoção da matriz metálica sem sofrer deformações permanentes (Figura 25).



Figura 25 – A) CP pronto na matriz metálica; B) remoção dos excessos de adesivo com lâmina de bisturi e C) CP pronto fora da matriz.

Em seguida, foram colocados em um dessecador (ependorfes com sílica gel no fundo e gaze por cima da sílica) e transferidos para uma estufa a 37°C. Após 24 horas,

os espécimes foram periodicamente pesados em uma balança analítica até obtenção de uma massa uniforme ou seja $m1$ (isto é, a perda de massa do espécime foi de menos de 0,1 mg entre dois períodos consecutivos de 24h) (Figura 26).

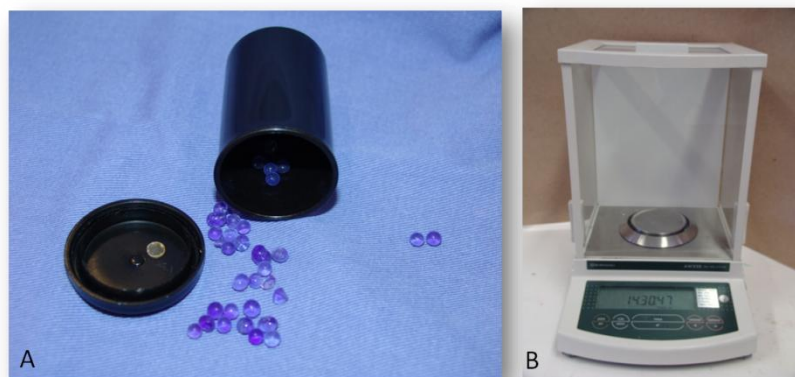


Figura 26 – A) CPS sendo dessecados em sílica e B) pesados em balança de precisão.

Quando esta massa uniforme foi alcançada, a espessura e o diâmetro dos espécimes foram mensurados usando um paquímetro digital (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tóquio, Japão) com três casas decimais de precisão, e estas medidas foram empregadas para calcular o volume (área x espessura) de cada espécime em mm^3 (Figura 27).

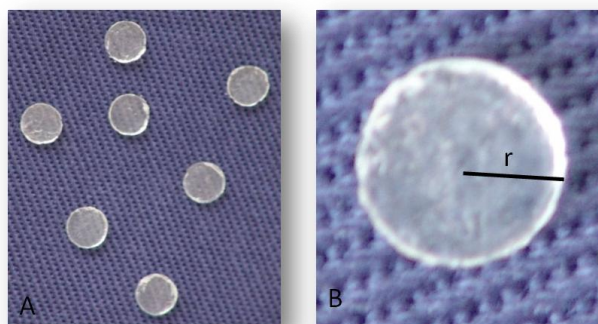


Figura 27 – A) CPS concluído e B) cálculo do volume no detalhe mostrando a mensuração do r .

Depois da estabilização do peso, os espécimes foram colocados individualmente em ependorfes contendo 10 mL de água destilada, cada um, e recolocados na estufa a 37°C. Após períodos fixos de 1 h (até 8 h) e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 e 28 dias, os ependorfes foram removidos da estufa e mantidos em temperatura ambiente por 30 min. Após cada um destes períodos, os espécimes foram secados com papel absorvente e pesados em uma balança analítica (m_2) e retornados para a água destilada (Figura 28).

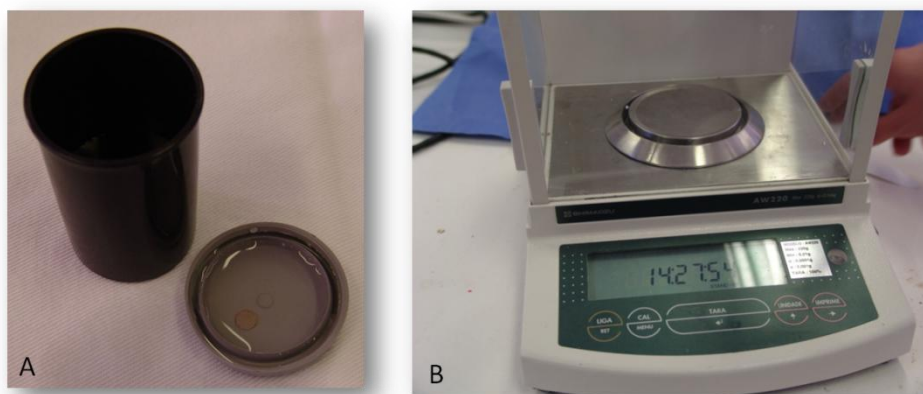


Figura 28 – A) Armazenamento em 10 ml de água destilada e mensuração do m_2 a cada 1 h (por 8 h), após 24 h, todos os dias por uma semana, 14 e 28 dias.

Assim a massa de cada espécime foi mensurada de hora em hora (até 8 h) no primeiro dia e diariamente até o sétimo dia, depois a massa foi mensurada após 14, 28 dias. Após o período de 28 dias (ou 4 semanas), os espécimes foram removidos da água destilada, armazenados novamente em ependorfes com sílica gel e pesados diariamente até obtenção de uma massa constante (m_3) da mesma forma que o descrito em m_1 (Figura 29).



Figura 29 – A) Nova desidratação e B) mensuração do m_3 .

Para obtenção do valor do volume, m_1 , m_2 , m_3 foram feitas três mensurações e calculando-se a média entre elas em cada tempo. A massa inicial (m_1) foi usada como parâmetro para verificar a mudança de massa de cada material após um intervalo fixo de tempo, durante os primeiros 28 dias. A sorção de água (SA) e a solubilidade (SO) durante o período de 28 dias foram calculadas para cada material com as seguintes fórmulas:

$$SA = (m_2 - m_3)/V \text{ e}$$

$$SO = (m_1 - m_3)/V.$$

3.2.3. LIBERAÇÃO DE CLOREXIDINA

Uma série de soluções padrão contendo 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 $\mu\text{g/mL}$ diacetato de clorexidina (99% pura; SIGMA, St. Louis, MO, E.U.A.) foi utilizada para obter uma curva com uma regressão linear (Figura 30) entre os valores de absorvância e concentrações de clorexidina por um método espectrofotométrico (10S

Genesys Espectrofotômetro de UV-Vis, Thermo Scientific, Madison, WI, E.U.A.). O pico de absorvância máxima de CDA foi confirmada a 260 nm.

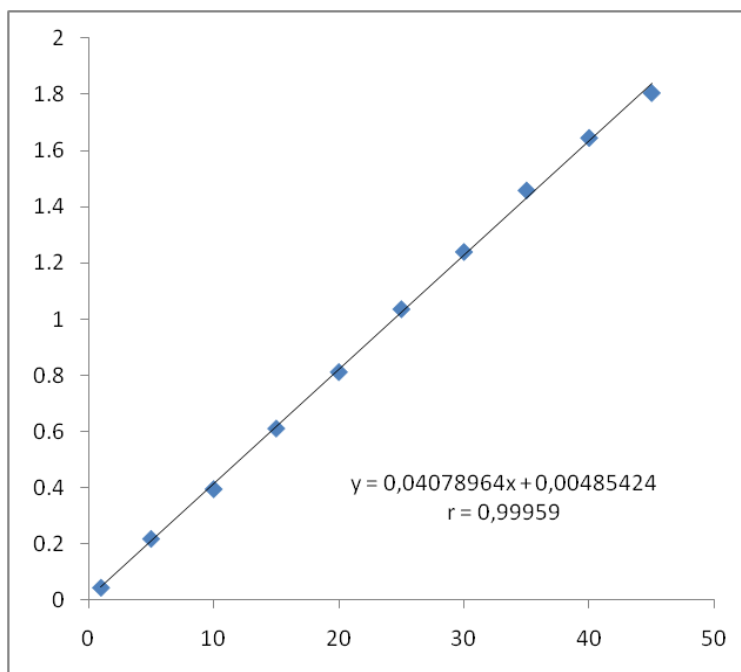


Figura 30 - Curva analítica de regressão linear da clorexidina.

Outros novos dez discos de cada adesivo experimental foram produzidos da mesma maneira para descrito no item de sorção de água e de solubilidade. Cada um foi e armazenados em água desionizada e depois de intervalos de tempo apropriados (1, 3 e 12 horas e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 21 e 28 dias), valores da absorvância destas soluções de armazenamento foram obtidos a 260 nm e convertidos para as quantidades de CDA liberada com base na curva linear analítica (Figura 30) anteriormente preparada. Assim, o valor de absorvância (UV) a 260 nm dos controles 0% CDA incorporação de clorexidina foi subtraído aos produzidos a partir de discos com clorexidina considerando a liberação de monômero concomitante. A liberação cumulativa foi obtida para 28 dias e foi representada em duas formas: como

percentagem (%) de clorexidina liberado e como miligrama (*mg*) de clorexidina liberado, por grama (*g*) de cada condição experimental (Riggs et al. 43 2000, Hiraishi et al. 47 2008).

A avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial (Equação 1), ao modelo biexponencial (Equação 2), ao modelo de ordem zero (Equação 3) e ao modelo de Weibull (Equação 4), considerando os resultados do critério de seleção de modelo (MSC), do coeficiente de correlação, do ajuste gráfico e da coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo.

$$\%D = 100(1 - e^{-kt})$$

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$$

$$\%D = kt$$

$$\%D = 100[1 - e^{-(t/Td)^b}]$$

Onde: $\%D$, o percentual do fármaco dissolvido no tempo t ; k , α e β , as constantes cinéticas de dissolução verificadas; A e B , as concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; Td , o tempo no qual 63,2 % do fármaco é dissolvido; b , o parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Equação 5) ou lei das potências foi também aplicado, permitindo a obtenção dos parâmetros a e n , com a finalidade de ampliar a informação sobre o mecanismo de liberação do fármaco a partir dos sistemas microparticulados.

$$ft = at^n$$

Onde: a , a constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n , o expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação; ft representa a fração do fármaco dissolvido no tempo t .

Para sistemas esféricos, a lei das potências apresenta duas interpretações físico-químicas distintas. Quando n assume um valor inferior a 0,43, isso indica que a liberação da substância é controlada por difusão (mecanismo de transporte Fickiano). Quando n é superior a 0,85, indica que a liberação é controlada pelo inchamento do polímero (transporte caso II ou mecanismo de transporte não-Fickiano). Valores de n entre 0,43 e 0,85 estão relacionados com a sobreposição de ambos os fenômenos, denominado de transporte anômalo (Siepmann & Peppas 55 2001). Os métodos modelo-dependentes destinados à avaliação dos perfis de liberação foram aplicados com o auxílio do software *MicroMath Scientist*® (versão 2.01, SL, E.U.A.). O software *MathWorks Matlab*® R2012a (Natick, MA, EUA) foi utilizado para obter um intervalo de tempo necessário para se atingir uma liberação de 50% da clorexidina liberada.

3.2.4 ANÁLISE DE DADOS DO EXPERIMENTO 3

As médias dos dados de sorção de água, solubilidade e liberação de clorexidina foram calculados para cada condição experimental e avaliados aos 28 dias para cada propriedade. Os dados para cada adesivo foram avaliados por uma análise de variância de um fator (concentração de clorexidina). Comparações múltiplas entre os diferentes grupos foram avaliados através do Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4- DISCUSSÃO GERAL

As evidências científicas atuais permitem especular que o comprometimento da interface de união dentina/resina composta é provavelmente o resultado de um efeito combinado da degradação de seus componentes resinosos que gradualmente absorvem água (Ito et al. 56 2005; Malacarne et al. 57 2006), tornando-se cada vez mais permeáveis e susceptíveis à hidrólise (Ferracane et al. 58 2005), e da degradação do substrato dentinário desmineralizado exposto, não protegido pela resina, que também está sujeito à hidrólise (Pashley et al. 20 2004).

A redução da resistência mecânica da interface de união é freqüentemente acompanhada por alterações morfológicas que revelam a desnaturação parcial ou completa de seus constituintes, isto é, das resinas compostas, mas especialmente, dos sistemas adesivos e da dentina modificada pelo procedimento adesivo (Breschi et al. 31 2010). O comprometimento isolado, ou em conjunto, desses componentes são os responsáveis por reduzir a sobrevida das restaurações adesivas (De Munck et al. 61 2004; Carrilho et al. 5 2005).

O fenômeno mais conhecido e descrito na literatura é o da degradação do componente resinoso. Este ocorre devido ao fato de que a absorção de água pelo polímero atua como um agente plastificador (Ito et al. 56 2005; Malacarne et al. 57 2006), alterando parcialmente a energia de coesão das cadeias poliméricas (Jacobsen, Soderholm 62 1995; Ferracane 58 2006). No início, a presença da água causa a diminuição prematura das propriedades mecânicas do polímero (Carrilho et al. 5 2005), que com o passar do tempo resulta em hidrólise de suas moléculas, ocasionando a

falha prematura da estrutura polimérica formada. Qualquer sistema adesivo disponível no mercado atualmente produzirá interfaces de união que cedo ou tarde apresentará degradação mecânica de sua estrutura (Ferracane 58 2006).

Entretanto, apenas recentemente foi demonstrado que a degradação das fibrilas de colágeno possa ocorrer pela presença de enzimas endógenas conhecidas como metalo-proteinases (MMPs) (Pashley et al. 20 2004; Hebling et al. 13 2005; Carrilho et al. 15 2007) e, mais recentemente ainda, catepsinas (Carrilho 59 2012).

Durante os procedimentos de união das resinas compostas aos tecidos duros do dente, a dentina deve ser condicionada por soluções ou monômeros ácidos tendo, assim, parte de sua estrutura mineral removida. Desta forma, presume-se que não apenas o colágeno seja exposto, mas também proteínas não-colagênicas, como por exemplo, enzimas proteolíticas (metalo-proteinases, catepsinas, etc). Se durante a aplicação do sistema adesivo, os monômeros infiltrassem completamente por todos os espaços interfibrilares da dentina desmineralizada, copolimerizando-se, provavelmente as MMPs expostas pelo condicionamento seriam novamente “fossilizadas”, permanecendo inativas. Entretanto sabe-se que os sistemas de união disponíveis, invariavelmente, falham nesta infiltração (Wang & Spencer; 2003 19), portanto inúmeros sítios da matriz dentinária desmineralizada poderão permanecer completamente expostos. Além disso, já foi demonstrado que sistemas adesivos têm a capacidade de reativar as MMPs, sendo esta capacidade diretamente proporcional à acidez do sistema adesivo aplicado (Mazzoni et al. 14 2006). Estes fatores contribuem na interpretação atual de que as MMPs estão diretamente envolvidas na degradação

do colágeno exposto durante o procedimento adesivo (Pashley et al. 20 2004; Mazzoni et al.14 2006).

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. 27 2006). Contudo, também existem vários inibidores exógenos (Carrilho, 59 2012). O mais utilizado é a clorexidina (CHX), nas suas diferentes formas (digluconato e diacetato).

A clorexidina é um composto orgânico conhecido por sua potente ação antisséptica e antibacteriana, que age sobre um largo espectro de microorganismos entre gram-positivos, gram-negativos, fungos e alguns tipos de vírus (Stanley et al. 32 1989). Mostra-se efetivo na inibição de pelo menos três tipos de metalo-proteinases MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (Gendron et al. 33 1999). Os autores acreditam que o efeito inibitório da CHX sobre essas metaloproteinases se deve a uma ação quelante, seqüestradora de cálcio (Carrilho et al. 36 2007).

Vários estudos demonstraram que a aplicação de um primer contendo CHX após o condicionamento ácido e previamente a aplicação de sistemas adesivos demonstrou melhoria da longevidade de união à dentina (Hebling et al. 13 2005; Carrilho et al. 36 2007). Entretanto, alternativas que simplificassem o protocolo clínico foram na sequência avaliadas. Primeiramente incluindo CHX em um ácido fosfórico, sendo os resultados semelhantes ao uso de um *primer* de CHX (Stanislawczuk et al. 37 2009 ; Stanislawczuk et al. 38 2011). Seguindo a mesma tendência foi proposta a

inclusão de CHX em sistemas adesivos, contudo, os dados de longevidade de união à dentina são controversos (Zhou et al. 39 2009; Zhou et al. 40 2010; De Munck et al. 41 2009; De Munck et al. 42 2010). Isto se deve principalmente ao tipo de adesivo utilizado, mas também a concentração de CHX adicionada.

Quando concentrações muito altas, tais como 1-5% de CHX são adicionadas a adesivos, ocorre significativo aumento da solubilidade (Hiraishi et al. 47 2008) e diminuição do módulo de elasticidade e grau de conversão do polímero formado (Cadenaro et al. 48 2009). Sendo assim, é fundamental testar a influência de diferentes concentrações de CHX em várias propriedades adesivas, como no Experimento 1. Nesse estudo, a adição ou não da clorexidina em diferentes concentrações em sistemas adesivos convencionais simplificados não influenciou nas propriedades de resistência de união e nanoinfiltração, bem como de módulo de elasticidade e nanodureza da camada híbrida e da camada de adesivo, assim como também demonstrado por Zhou et al. (39) em 2009 para sistemas adesivos autocondicionantes.

A adição de CHX também não afetou as propriedades de sorção e solubilidade dos materiais quando comparado com os respectivos grupos controle, conforme pode ser observado no Experimento 3. Em outras palavras, isto significa que a adição de CHX não fez estes materiais mais propensos à degradação precoce. Embora estudos anteriores demonstrassem que a adição de CHX para adesivos convencionais de dois passos poderia conduzir a uma maior sorção de água, (Hiraishi et al. 47 2008) menor grau de conversão e menor módulo de elasticidade (Cadenaro et al. 48 2009), isto foi apenas observado para concentrações de CHX superiores a 1%. Concentrações inferiores a 0,2% parecem não afetar de maneira significativa a sorção de água e

solubilidade dos adesivos usados no presente estudo, assim como suas propriedades adesivas imediatas (Experimento 1).

Quando são observados os resultados do Experimento 2, pode-se observar que, para os dois adesivos testados, ocorreu um significativo aumento da longevidade da união quando foi adicionado CHX na composição dos materiais, e este fato ocorreu independentemente da concentração de CHX utilizada. Isto é indicativo de que, a presença de clorexidina dentro do adesivo agiu de forma semelhante as outras formas de aplicação de CHX já testadas (Hebling et al. 13 2005; Carrilho et al. 15 2007; Zhou et al. 39 2009; Zhou et al. 40 2011; Stanislawczuk et al. 37 2009; Stanislawczuk et al. 38 2011), inibindo as MMPs e catepsinas e assim diminuindo o efeito de degradação da interface de união.

Obviamente que, diferentemente da aplicação como *primer* ou dentro da composição do ácido, a liberação dentro de um adesivo, especialmente depois de ocorrer a polimerização, é muito mais complicada, já que a CHX está “encapsulada” dentro da reticulação formada pelo polímero. Contudo, como demonstrado pelo Experimento 3, ocorre significativa liberação de CHX dentro dos primeiros 28 dias em contato com a água, ou seja, cerca de 20% da CHX incorporada no adesivo XP e de 8,2-12,4% para material de AM.

Contudo, isto não colabora na explicação para o fato de ocorrer preservação da união após 1 ano, já que não se sabe se a CHX ainda estará presente após este período. Com base no perfil de liberação testado e descrito no Experimento 3 pode ser calculado o tempo para que os adesivos atinjam 50% de CHX liberada, assumindo que

o processo de difusão que explica o fenômeno dentro deste material é a difusão Fickiana. Os resultados mostram que seriam necessários cerca de um a um ano e meio para o XP Bond e Ambar, respectivamente, para liberar 50% da CHX adicionada.

Esta presença de CHX sendo liberada por um longo período de tempo pode ser responsável pela diminuição da degradação observada, já que concentrações tão pequenas quanto 0,002% resultam na inibição completa da atividade da MMP-9, enquanto que a atividade da MMP-2 pode ser inibida por uma concentração de CHX tão baixa quanto 0,0001% e concentrações de CHX entre 0,01 e 0,02% são suficientes para inibir completamente as atividades de MMP-8 (Gendron et al. 33 1999).

Como mencionado por Hiraishi e colaboradores em (47) 2008 os adesivos com CHX interagem quando em contato com um ambiente externo, de modo que, após um certo período de tempo, a concentração pode já não ser suficiente para exercer qualquer inibição apreciável. No entanto, a CHX liberada por estes adesivos que estão em embricamento com a dentina, através da camada híbrida, faz com a CHX fique “aprisionada” e tenha a tendência de permanecer no interior dos espaços interfibrilar devido à inerente da substantividade CHX em desmineralizada e mineralizado dentina humana (Carrilho et al. 34 2010).

Em estudos anteriores, onde a CHX foi testada como *primer* em concentrações menores do que 2% e por tempo inferiores de aplicação (menos de 60s), ou dentro de um ácido fosfórico (2% de CHX) aplicado por apenas 15s, os resultados mostraram excelentes resultados após 6-24 meses de armazenagem em água (Stanislawczuk et

al. 37 2009; Breschi et al. 31 2010 ; Loguercio et al. 60 2010; Stanislawczuk et al. 38 2011).

Espera-se que esta lenta e controlada liberação de CHX a partir desses adesivos em torno fibrilas de colágeno na camada híbrida possa prolongar a expectativa de vida de restaurações adesivas com resina composta . No entanto investigações de mais longo prazo em relação a adição de CHX em adesivos ainda deve ser conduzida.

Apesar do efeito da CHX ter sido, de maneira geral, semelhante entre os adesivos estudados, o adesivo XP apresentou uma degradação da união maior quando comparado ao AM, mesmo com a presença de CHX (Experimento 2). Isto pode ser explicado pelo fato de que o adesivo XP demonstrou maior quantidade de sorção e de solubilidade e, conseqüentemente, liberou mais rapidamente a CHX presente no seu conteúdo (Experimento 3). Conforme demonstrado por Hiraishi et al. (47) em 2008 a liberação de CHX em sistemas adesivos é diretamente proporcional a sorção de água que ocorre dentro do material, indicando que o XP deve ser mais hidrófilo do que o AM.

Geralmente, os sistemas adesivos são compostos por metacrilato de muitos monômeros que contêm várias ligações cruzadas, tais como UDMA, Bis-GMA e TEGDMA , com um comportamento mais hidrófilo. Contrariamente ao AM, o XP contém HEMA que é reconhecido como sendo altamente hidrofílico (Van Landuyt et al. 61 2007). Quando o monômero HEMA está contido no adesivo, estes apresentam a absorção de água muito superior a adesivos sem o monômero ou HEMA-free. Além disso, o adesivo XP também contém PENTA, que é um monômero resinosos muito

hidrófilo e pode ter contribuído para a maior sorção de água deste material em comparação com adesivo AM.

Seria desejável que quando CHX fosse adicionada aos sistemas adesivos, esta fosse liberada em quantidades suficientes para preservar a união a dentina ao longo do tempo, sem diminuição das propriedades mecânicas do polímero formado intrinsecamente e em contato com a estrutura dentária. Os resultados deste estudo fornecem evidências de que a adição de CHX em concentrações de até 0,2% para os comerciais convencionais de dois passos é uma técnica viável para proporcionar a liberação controlada de CHX em concentração suficiente para inibir a atividade das MMPs ao longo do tempo, já que ocorreu preservação da união, sem comprometer a sorção, solubilidade e as propriedades mecânicas, em geral. No entanto, devido a várias diferenças entre os adesivos comerciais disponíveis no mercado, esta adição de CHX deve ser individualizada conforme a formulação química variada dos mesmos para que se tenha um efeito benéfico e profundo sobre a estabilidade das moléculas de CHX na solução.

5- CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo conclui-se que:

A utilização do diacetato de clorexidina em adicionado em concentrações iguais ou inferiores a 0,2% a sistemas adesivos convencionais de 2 passos não interferiu na resistência de união, nanoinfiltração, nanodureza e modulo de elasticidade no tempo imediato, assim como também não prejudicou a sorção e solubilidade, mas diminuiu e atenuou de acordo com o adesivo utilizado a degradação da união da interface de união após 1 ano de armazenamento em água, devido a doação de clorexidina que ocorreu ao longo do tempo.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Carvalho RM. Adesivos dentinários. Fundamentos para a aplicação clínica. Rev Dent Rest 1998; 1: 62-96.
- 2- Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. Oper Dent 2003; 28: 215-235.
- 3- Carvalho RM, Carrilho MRO, Pereira LCG, Garcia FCP, Marquezini Jr L, Andrade e Silva SM, Kussmaul APM. Sistemas adesivos: fundamentos para a compreensão de sua aplicação e desempenho clínico. Biodonto 2004; 2: 81-85.
- 4- Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. Crit Rev Oral Biol Med 2001; 12: 136-151.
- 5- Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. Dent Mater 2005; 21: 232-241.
- 6- Burrow MF, Satoh M, Tagami J. Dentin bond durability after three years using a dentin bonding agent with and without priming. Dent Mater 1996; 12: 302-307.
- 7- Hashimoto H, Ohno H, Sano H, Kaga M, Ogushi H. Degradation patterns of different adhesives and bonding procedures. J Biomed Mater Res 2003; 66: 324-330.
- 8- - Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? J Can Dent Assoc 2003; 69: 726-731.
- 9- Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. Biomater 1996; 17: 103-114.

- 10- FR, Pashley DH, Peters MC. Adhesive permeability affects composite coupling to dentin treated with a self-etching adhesive. *Oper Dent* 2003; 28: 610-621.
- 11- Chersoni S, Suppa P, Grandini S, Goracci C, Monticelli F, Yiu C, et al. In vivo and in vitro permeability of one-step self-etch adhesives. *J Dent Res* 2004; 83: 459-464.
- 12- Tay FR, Pashley DH, Peters MC. Adhesive permeability affects composite coupling to dentin treated with a self-etching adhesive. *Oper Dent* 2003; 28: 610-621.
- 13- Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005; 84: 741-746.
- 14- Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breaschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley DH, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentin by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006; 27: 4470-4476.
- 15- Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay FR, de Goes MF, , Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breaschi L, Pashley DH. In vivo preservation oh hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007; 86: 529-533.
- 16- Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano. Dental Adhesion review: aging and stability of bonded interface. *Dent Mater* 2007; 24: 90-101.
- 17- Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials*. 2005; 26: 1035-1042.
- 18- Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, Kumagai H, Kudou Y, Kubota M, Oguchi H. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2003; 66: 287-298.

- 19- Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003; 82: 141-145.
- 20- Pashley DH, Tay FR, Yiu CKY, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho R, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83: 216-221.
- 21- Armstrong SR, Jessop JLP, Vargas MA, Zou Y, Qian F, Campbell JA, Pashley DH. Effects of exogenous collagenase and cholesterol esterase on the durability of the resin-dentin bond. *J Adhes Dent* 2006; 8: 151-160.
- 22- Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breaschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006; 114:160-166.
- 23- 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.
- 24- Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1362-1378.
- 25- van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 2003; 37: 58-65.
- 26- 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.

- 27- 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: 306-321.
- 28- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007; 65: 1-13.
- 29- Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Román JS, Toledano M. Zinc-doped dentin adhesive for collagen protection at the hybrid layer. *Eur J Oral Sci* 2011; 119: 401-410.
- 30- De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res* 2009; 88:1101-1106.
- 31- Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Visintini E, Cadenaro M, Tay FR, De Stefano Dorigo E, Pashley DH. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater* 2010; 26:571-578.
- 32- Stanley A, Wilson M, Newman HN. The in vitro effects of chlorheridine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 259-264.
- 33- 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: 437-439.
- 34- Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater* 2010; 26:779-785.
- 35- Castro FL, de Andrade MF, Duarte Junior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorherxidine on microtensile bond strengrh of composite to dentin. *J Adhes Dent* 2003; 2: 129-138.

- 36- Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldelli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. Chlorhexidine Preserves Dentin Bond in vitro. *J Dent Res* 2007; 86: 90-94.
- 37- Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler , Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent* 2009; 34: 481-490.
- 38- Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent* 2011; 39: 40-47.
- 39- Zhou J,Tan J,Chen L,Li D,Tan Y.The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. *J Dent* 2009; 37:807–812.
- 40- Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L. Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent*. 2010; 12: 27-31.
- 41- De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res* 2009; 88:1101-1106.
- 42- De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Enzymatic degradation of adhesive–dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci* 2010; 118:494-501.
- 43- Riggs PD, Braden M, Patel M. Chlorhexidine release from room temperature polymerising methacrylate systems. *Biomaterials* 2000; 21: 345–351.

- 44- Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials* 2004; 25: 5423–5431.
- 45- Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM. Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials*. 2005; 26: 7145-7153.
- 46- Anusavice KJ, Zhang NZ, Shen C. Controlled release of chlorhexidine from UDMA-TEGDMA resin. *J Dent Res*. 2006; 85: 950-954.
- 47- Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater* 2008; 24:1391-1399.
- 48- Cadenaro M, Pashley DH, Marchesi G, Carrilho M, Antoniolli F, Mazzoni A, et al. Influence of chlorhexidine on the degree of conversion and E-modulus of experimental adhesive blends. *Dent Mater* 2009; 25:1269-1274.
- 49- Asmussen E, Peutzfeldt A. The influence of relative humidity on the effect of dentin bonding systems. *J Adhes Dent*. 2001; 3: 123-127.
- 50- Reis A, Grande RH, Oliveira GM, Lopes GC, Loguercio AD. A 2-year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. *Dent Mater* 2007; 23: 862–870.
- 51- Higashi C, Michel MD, Reis A, Loguercio AD, Gomes OM, Gomes JC. Impact of adhesive application and moisture on the mechanical properties of the adhesive interface determined by the nano-indentation technique. *Oper Dent*. 2009; 34: 51-57.
- 52- Urabe I, Nakajima S, Sano H, Tagami J. Physical properties of the dentin-enamel junction region. *Am J Dent*. 2000; 13: 129-135.

- 53- Oliver WC, Pharr GM. Improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res* 1992; 7: 1564-1583.
- 54- Brotzen FR. Mechanical testing of thin films. *Int Mater Rev* 1994; 39: 24-245.
- 55- Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 48: 139-157.
- 56- Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, Rueggeberg FA, Foulger S, Saito T, Nishitani Y, Yoshiyama M, Tay FR, Pashley DH. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials* 2005; 26:6449-6459.
- 57- Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater* 2006; 22: 973-980.
- 58- Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater* 2006; 22:211-222.
- 59- Carrilho MR. Can Exogenous Protease Inhibitors Control Dentin Matrix Degradation? *J Dent Res* 2012 Sep 28.
- 60 – Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin–dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sciences* 2009; 117:587 – 596.
- 61- Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007; 28: 3757-85.

ANEXO A

27-May-2012

Dear Mr. Grande:

Thank you for submitting your manuscript entitled "Effects of chlorhexidine incorporation into etch-and-rinse adhesives on the bonding and mechanical properties of adhesive interfaces" to the European Journal of Oral Sciences. It has been successfully submitted online and is presently being given full consideration.

Your manuscript ID number is EOS-5894-OA-12.

Please refer to the above manuscript ID in all future correspondence or when contacting the Editorial Office for questions. If there are any changes in your mailing address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/eos> and edit your user information as appropriate.

We will contact you again as soon as we have the necessary information for an editorial decision. You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/eos> .

Sincerely,

Editorial Office
European Journal of Oral Sciences

Effects of chlorhexidine incorporation into etch-and-rinse adhesives on the bonding and mechanical properties of adhesive interfaces

Rodrigo Stanislawczuk¹ , Douglas Augusto Roderjan² , Fabiane Pereira³ , Alessandra Reis⁴ , Milton Michel⁵ , Alessandro Dourado Loguercio⁴

¹ Graduate student, Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil; Adjunctive Professor, Department of Restorative Dentistry, Center of Higher Education of Campos Gerais, Ponta Grossa, Brazil.

² Graduate student, Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

³ Undergraduate student, School of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

⁴ Adjunctive Professors, Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

⁵ Department of Materials Engineering, University Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

Running title: Chlorhexidine incorporation in an adhesive

Corresponding Author:

Alessandro D. Loguercio
Universidade Estadual de Ponta Grossa – Pós Graduação em Odontologia, Rua Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M, Sala 64A – Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, 84030-900
e-mail: aloguercio@hotmail.com

Stanislawczuk R, Roderjan DA, Pereira F, Reis A, Michel M, Loguercio AD. Effects of chlorhexidine incorporation into etch-and-rinse adhesives on the bonding and mechanical properties of adhesive interfaces. Eur J Oral Sci.

Investigate the microtensile bond strength, nanoleakage, nano-hardness and Young's modulus of resin-dentin bonding components produced by two simplified etch-and-rinse adhesive with different concentrations of chlorhexidine diacetate. 99.9% of chlorhexidine diacetate were added to Ambar and XP Bond in concentrations of 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2 wt%. Fifty extracted third molars were randomly divided into 10 groups of 5 teeth each. Sticks (0.8 mm²) were prepared for microtensile bond strength testing (0.5 mm/min). For nanoleakage, 2 bonded sticks from each tooth were prepared to quantitative analysis in EDX-SEM. Nano-indentations were made on the adhesive interface and nano-hardness and Young's modulus calculated. The adhesive properties of the hybrid layers with or without chlorhexidine into the adhesives were statistically similar. The addition of chlorhexidine in concentrations higher than 0.1 wt% reduced slightly the Young's modulus of the adhesive layer. Chlorhexidine in concentrations lower than 0.1 wt% incorporated in the two simplified etch-and-rinse adhesives did not impair the immediate resin-dentin bond strength, nanoleakage and mechanical properties of the adhesive and hybrid layers.

Key words: Adhesives systems, chlorhexidine, nanoleakage, microtensile bond strength, nano-hardness.

INTRODUCTION

Biodegradation of resin-dentin involves a cascade of events involving the extraction of the resins that had infiltrated the dentin matrix via water-filled nanometer-sized voids within the hybrid layer followed by enzymatic attack of the exposed collagen fibrils (1). The first evidence that acid-etched dentin can be degraded by endogenous proteolytic enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMPs) was reported by PASHLEY *et al.* (2) , revealing that demineralized collagen matrices stored in artificial saliva were almost completely destroyed after 250 days in vitro. In contrast, collagen fibrils were preserved if the demineralized matrices were stored for the same time in a solution containing an MMP inhibitor.

The most used and tested MMP inhibitor is 2% of chlorhexidine digluconate (CHX). This inhibitor was first applied for 60 s on the demineralized dentin and this procedure was shown to preserve the integrity of hybrid layers under clinical and laboratory studies (3, 8). Despite the advantages of using 2% CHX for 60 s on the demineralized dentin, this procedure adds another bonding step which is in contrast to the clinician's need for simplification (9).

More simplified protocols such as reduction of CHX concentration and application times (7) (10, 13) were shown to be as effective as the application of 2% CHX for 60 s since it was shown that very low CHX concentrations can inhibit MMP activity (14).

However, from a clinical standpoint, the most favorable condition of incorporating CHX to the bonding protocol would be its addition to one of the components of the adhesive systems as this would not add an extra step to the bonding procedure. A recent

study has reported favorable results after the inclusion of CHX in the phosphoric acid. This allowed the achievement of resin–dentin bond strength as stable as those achieved by the application of an aqueous solution of 2% CHX after 6 and 24 months of water storage (7) (13).

When it comes to the inclusion of CHX in primers and/or adhesives, controversial results have been published (15, 18). One factor that may account for such controversy is the different CHX concentrations added (15) (17, 18). So far, only two studies evaluated the effects of CHX concentration on the bonding properties and these studies employed self-etch systems and reported controversial findings (15) (19) .

Thus, the optimal concentration of CHX that may be added in the adhesive to produce stable bonds without jeopardize other mechanical properties of the adhesive layer is yet to be addressed. It was already demonstrated that depending on the CHX concentration, such addition may jeopardize the degree of conversion, elastic modulus and the solubility of hydrophilic adhesive systems (20, 21) as well as other polymeric materials (22, 24).

Therefore this in vitro study was designed to test if the addition of different concentrations of diacetate chlorhexidine into two simplified etch-and-rinse adhesive system could affect the immediate resin-dentin bond strength, nanoleakage and in situ nanohardness and young's modulus of the adhesive and hybrid layers.

METHODS AND MATERIALS

Teeth selection and preparation

Fifty caries-free extracted human third molars were used. The teeth were collected after the patient's informed consent. The local University Ethics Committee approved this study under protocol number 1693/09. Teeth were disinfected in 0.5% chloramine, stored in distilled water and used within 6 months after extraction. A flat and superficial dentin surface was exposed on each tooth after wet grinding the occlusal enamel on # 180-grit SiC paper. The enamel-free, exposed dentin surfaces were further polished on wet # 600-grit silicon-carbide paper for 60 s to standardize the smear layer.

Formulation of the experimental adhesives

The experimental adhesive resins from the present study were formulated by using the simplified etch-and-rinse adhesive systems XP Bond [XP] (Dentsply, York, PA, USA) and Ambar [AM], (FGM Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brazil). Detailed composition, mode of application and batch number of the adhesives are depicted in Table 1. Five experimental adhesive systems were formulated according to the addition of different concentrations of chlorhexidine diacetate [CHX] (99.9% pure, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) (wt%): 0 (control, commercial material), 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2%. The CHX was added to the resin and mechanically mixed by a motorized mixer (stirring).

Restorative procedure

The adhesives were applied as per manufacturers' instructions (Table 1) and they were light cured with a halogen light set at 600 mW/cm² during 10 s (VIP, Bisco, Schaumburg, IL, USA). Resin composite build-ups (Opallis, FGM, Joinville, SC, Brazil) were placed on the bonded surfaces (3 increments of 1.5 mm each) and were individually light

activated for 40 s. All bonding procedures were carried out by a single operator at 24°C and 50% relative humidity (25). Five teeth were used for each experimental group.

Storage and sticks preparation

After storage of the bonded teeth in distilled water at 37°C for 24 h, they were longitudinally sectioned in both “x” and “y” directions across the bonded interface with a diamond saw in a Labcut 1010 machine (Extec Corp., Enfield, CT, USA), under water cooling at 300 rpm to obtain bonded sticks with a cross-sectional area of approximately 0.8 mm². The number of premature failures (PF) per tooth during specimen preparation was recorded. The cross-sectional area of each stick was measured with the digital caliper to the nearest 0.01 mm and recorded for subsequent calculation of the microtensile bond strength (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tokyo, Japan). Two bonded sticks were randomly selected for NL and another two for nanohardness measurement. The remaining bonded sticks were taken to microtensile testing.

Microtensile testing (μ TBS)

Each bonded stick were attached to a modified device for microtensile testing with cyanoacrylate resin (Zapit, Dental Ventures of North America, Corona, CA, USA) and subjected to a tensile force in a universal machine (Kratos, São Paulo, SP, Brazil) at 0.5 mm/min. The failure modes were evaluated at 400X (HMV-2, Shimadzu, Tokyo, Japan) and classified as cohesive (failure exclusive within dentin or composite, C), adhesive (failure at resin/dentin interface – A), or adhesive/mixed (failure at resin/dentin interface that included cohesive failure of the neighboring substrates, A/M).

Nanoleakage test (NL)

Two bonded sticks from each tooth were coated with two layers of nail varnish applied up to within 1 mm of the bonded interfaces. The specimens were re-hydrated in distilled water for 10 min prior to immersion in the tracer solution for 24 h. Ammoniacal silver nitrate was prepared according to the protocol previously described by TAY *et al.* (26). The bonded sticks were placed in the ammoniacal silver nitrate in darkness for 24 h, rinsed thoroughly in distilled water, and immersed in photo developing solution for 8 h under a fluorescent light to reduce silver ions into metallic silver grains within voids along the bonded interface.

All sticks were wet-polished with 600-grit SiC paper to remove the nail varnish. Then, the specimens were placed inside an acrylic ring, which was attached to a double-sided adhesive tape, and embedded in epoxy resin. After the epoxy resin had set, the thickness of the embedded specimens was reduced to approximately half by grinding with silicon carbide papers under running water. Specimens were polished with a 1000-grit SiC paper and 6, 3, 1 and 0.25 μm diamond paste (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA) using a polish cloth. They were ultrasonically cleaned, air dried, mounted on stubs, and gold coated (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein). Resin-dentin interfaces were analyzed in a field-emission scanning electron microscope operated in the backscattered electron mode and using energy dispersive X-ray spectrometry (EDX) (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK). The amount of silver nitrate uptake within the adhesive layer, hybrid layer and resin tags, in each stick, was measured with EDX in three regions (5 x 5 μm) of the bonded stick (left, center and right) (27). The total length of the

hybrid layer scanned for silver nitrate uptake measurement was approximately $75 \mu\text{m}^2$. The silver nitrate uptake was expressed as a percentage of the total area evaluated.

Nano-indentation

Two bonded sticks from each tooth were prepared for the nano-indentation measurements. They were individually embedded in a self-cure polyester resin (Milflex, Milflex Indústrias Químicas, São Bernardo do Campo, SP, Brazil) and after 24 h, the molds were manually polished via waterproof silicon carbide papers of decreasing abrasiveness (600, 1000, 1200, 1500 and 2000). The samples were then polished using soft discs with diamond sus-pensions (1 and $0.25 \mu\text{m}$) in an automatic polishing device (Aropol S; Arotec, Cotia, SP, Brazil) at 300 rpm. The polishing debris from each SiC paper and diamond paste were ultrasonically removed for five minutes, then again upon completion of the procedure. All samples were kept in the ultrasonic device for 20 min.

The computer-controlled Nano Indenter XP (TPS Systems Corp, Oak Ridge, TN, USA) was employed, mounted with a triangular pyramidal diamond indenter—Berkovich. By means of the computer-controlled X-Y table, the dried specimen was transferred to the indenter. An accurate calibration of the distance between the microscope and the indenter was run before testing to ensure a precise transfer of the pre-programmed positions to the indenter.

Prior to starting the measurement, two groups of nine equally spaced indentation positions were programmed for each region by a remote video control (connected to the light microscope attached to the nano-indenter device). In order to obtain precise

measurements, the interval of each indentation was twice the size of the indentation in each region, with the aim of avoiding corruption of the abutment (28).

In the central area of the resin composite and adhesive layer, the surface approach rate of the nano-indenter was set at 10 nm/s and the duration of the loading and unloading indentation was set at five seconds each. The pre-programmed distance among indentations for the dentin, adhesive layer and resin composite were 10 μm and 20 μm , respectively, with a load of 5 g. At the hybrid layer, the surface approach rate was the same; however, the load employed was 0.1 g and the indentations (n=9) were programmed for a distance of 3 μm . The reduction in load was required to reduce the indentation size so that the indentations could be positioned entirely within the area of the hybrid layer.

Epoxy resin replicas of all specimens were gold coated and analyzed under Scanning Electron Microscopy [SEM] (Shimadzu, Kyoto, Japan) to verify the indentation geometry and the accurate positioning of the pre-programmed indentations. Those found to be outside the specified areas were excluded from the sample. The nanohardness (NH) and Young's modulus (YM) of each area were computed following the method by OLIVER and PHARR (29).

Statistical analysis

The mean values of μTBS , NL, NH and YM from bonded beams originating from the same tooth were averaged for statistical purposes. The specimens with cohesive and premature failures were not included into the tooth mean of the μTBS . The data from each adhesive were subjected to a one-way analysis of variance and Tukey's test for

contrast of the means ($\alpha = 0.05$). A single mean and standard deviation taken from all specimens was calculated for the resin composite and mineralized dentin.

RESULTS

Approximately 22–25 sticks could be obtained per tooth, including those with premature failure. The mean cross-sectional area ranged from 0.79 to 1.02 mm² and no difference among groups was detected ($p > 0.05$). The percentage of specimens with premature failures and the frequency of each fracture pattern mode are shown in Table 2. All groups had a similar overall premature failure rate. A low percentage of cohesive failures in dentin occurred for all groups.

Microtensile bond strength test (μ TBS) and nanoleakage (NL)

The overall μ TBS means and silver nitrate percentages for the experimental groups are expressed in Table 3. For both adhesives, similar μ TBS values ($p = 0.62$) and NL ($p = 0.53$) were observed, regardless of the CHX concentration. In none of the conditions, it was observed a nanoleakage-free bonding interface. Representative SEM images at the resin–dentin interfaces for the experimental conditions are depicted in Figure 1. The silver nitrate uptake occurred mainly within the hybrid layer.

Nano-hardness (NH) and Yong's modulus (YM)

The mean values and standard deviations of NH (GPa) in the composite resin and mineralized dentin were 0.96 ± 0.8 and 0.62 ± 0.15 , respectively. For YM, the mean values and respective standard deviations (GPa) were 14.8 ± 1.1 and 17.5 ± 1.5 for the composite resin and mineralized dentin, respectively.

The overall NH and YM values for the experimental groups are depicted in Tables 4 and 5. The CHX incorporation in both adhesives did not affect the NH and YM from the hybrid layer (Table 5), despite some variations in the NH values seen for Ambar ($p = 0.03$, Table 5). In regard to the adhesive layer, the CHX added to both adhesives did not significantly affect the NH ($p = 0.73$; Table 5). However, the YM was significantly affected by the inclusion of CHX for both adhesives ($p = 0.01$ and $p = 0.03$, respectively for Ambar and XP Bond). For Ambar, reduced YM of the adhesive layer was seen with CHX addition of 0.1 and 0.2%. For XP Bond, this reduction was seen after addition of 0.2% of CHX.

DISCUSSION

Recent studies have examined the use of CHX before (30, 31) or after acid-etching (10, 12) (30, 31); as well as added to phosphoric acid (7) (13) (31) and they demonstrated immediate resin-dentin bond strengths comparable to those obtained control groups (without CHX). As under the above conditions, the CHX does not interfere with the chemistry of the adhesives formulations, no study has attempted to investigate the properties of the adhesive and hybrid layers after the use of this alternative bonding protocol.

On the other hand this may not be the case when CHX is added to the bottle of adhesives. According to Zhou *et al.* (17), the addition of CHX to the adhesive may lead to three main possible outcomes. CHX may not or may react with any component of the adhesive but keep their inhibitory activity against MMP or CHX may react and lose its inhibitory effect against MMPs. The findings of a recent study demonstrating partial collagenolytic activity of a CHX-containing self-etch adhesive (32) strengthen the

hypothesis that CHX may react with other chemicals presented in the adhesive formulation.

In fact it was already reported that CHX diacetate when ionized in solvents like alcohol or water, is characterized by being a strong base with cationic properties (33). But this reaction does not seem to jeopardize the ability of a CHX-containing self-etch adhesive to preserve the resin-dentin bond strength after water storage (32). Such interaction seems to be even favorable, since it is the cationic part of CHX molecules that binds to the negatively charged phosphate groups or to negative carboxyl groups in mineralized dentin crystallites or collagen matrix, respectively (34). Besides that the outstanding substantivity of CHX to dental substrate allows it to remain bonded in demineralized and mineralized dentin substrates regardless the CHX concentration or incubation time (35).

However some adverse effects of CHX incorporation on the mechanical properties of polymers (22, 24) (36, 37) and even adhesives (20, 21) were already described. The addition of more than 10% of CHX diacetate in 70% UDMA/30% TEGDMA composite resin was found to reduce the degree of conversion and increase the dissolution of organic components of the resin composite (24) due to the fact that the undissolved CHX diacetate act as fillers. For adhesive systems, the addition of 1 to 5% CHX was shown to significantly increase the polymer solubility (20), decrease the elastic modulus and slightly affect the degree of conversion of experimental hydrophilic adhesives (21).

In the present investigation, no significant difference in the immediate resin-dentin bond strength, nanoleakage and mechanical properties of hybrid layer produced with the

CHX-free and CHX-containing etch-and-rinse adhesives were observed. These controversial findings seem to be due to the amount of CHX incorporated in the adhesive formulation. In the present investigation, lower amounts of CHX diacetate (< 0.2 wt%) was added in the two etch-and-rinse adhesives. In agreement with our findings, previous studies have shown that CHX diacetate has a good compatibility with other chemicals when added to methacrylate polymers (33) (38) and in adhesive systems (15, 18).

An important consideration, however, should be made. A slight by significant decrease in the elastic modulus of the adhesive layer was detected for both adhesives when CHX was incorporated in concentrations of 0.1 and 0.2 wt%. Under such concentrations, the CHX could have acted as polymer plasticizer of the polymeric adhesive matrix. According to FERRACANE (39), the reduction of mechanical properties of polymeric matrix is a product of the separation of the polymer chains by a molecule that does not form primary chemical bonds with the chain, but simply serves as a space occupier.

Other studies have suggested that incorporating CHX diacetate into resin result in a higher level of residual monomers (36, 37), which may lead to greater weight loss of resin matrix. This was observed for resin composites (24) and for adhesive systems (20). Therefore, care should be taken when including CHX into adhesive systems as the benefits of CHX inclusion on MMP inhibition may be outweighed by the plasticizer-effect on the polymer network of adhesive systems, especially for CHX concentrations higher than 0.1%.

The results of the present investigation suggest that the inclusion of CHX into simplified etch-and-rinse adhesives is possible and does not impair the immediate

bonding and mechanical properties of the adhesives investigated as long as CHX is added in concentrations lower than 0.1 wt%. The MMP inhibitory effect of CHX in very low concentrations (14) lead us to suggest that the concentrations added to the adhesives formulations herein evaluated may have a beneficial effect of the preservation of the resin dentin bonds, but this is yet to be addressed for the experimental formulations of the present study.

In terms of long-term results, CHX containing adhesives were shown to preserve the integrity of dentin bond when added in concentrations higher than or equal to 0.1% in a self-etch adhesive (15). For the etch-and-rinse adhesive Schotchbond 1 XT, the addition of 0.05 wt% CHX diacetate was not capable to reduce the degradation of the resin-dentin bonds (18).

Based on that, it is worth mentioning that the amount of CHX addition into adhesives should be individually investigated as their chemical formulations are rather variable (40). This varied chemistry formulation of bonding resins presented in the market may have a profound effect on the stability of the CHX molecules into solution since it may affect the mechanical properties of the adhesives and its MMP inhibitory effect.

CONCLUSIONS

Within the limitations of this in vitro study, one may conclude that the incorporation of CHX diacetate in the two simplified etch-and-rinse adhesives Ambar (FGM) and XP Bond (Dentsply) in concentrations lower than 0.1 wt% did not impair the

immediate resin-dentin bond strength or the mechanical properties of the hybrid and adhesive layers.

References

- 1- Sano H. Microtensile Testing, Nanoleakage, and Biodegradation of Resin-Dentin Bonds *J Dent Res* 2006; **85**: 11-14.
- 2- Pashley DH, Tay FR, Yiu CKY, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho R, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; **83**: 216-221.
- 3- - Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005; **84**: 741-746.
- 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**: 107-111.
- 5- Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldelli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. Chlorhexidine Preserves Dentin Bond in vitro. *J Dent Res* 2007; **86**: 90-94.
- 6- Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Pizzatto E, Morais EC. Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. *Braz Oral Res* 2009; **23**: 340-345.
- 7- Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler , Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent* 2009; **34**: 481-490.
- 8- Ricci HA, Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Effect of chlorhexidine on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems to dentin of primary and permanent teeth. *Am J Dent* 2010; **23**: 128-132.
- 9- Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc* 2003; **69**: 726-731.
- 10- Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, Cadenaro M, Foulger S, Mazzoti G, Tay FR. *J Adhes Dent* 2009; **11**: 191-198.

- 11- Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci* 2009; **117**: 587-596.
- 12- Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane 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.
- 13- Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin–dentin interfaces. *J Dent* 2011; **39**: 40-47.
- 14- 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**: 437-439.
- 15- Zhou J, Tan J, Chen L, Li D, Tan Y. The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. *J Dent* 2009; **37**: 807-812.
- 16- Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L. Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent* 2010; **12**: 27-31.
- 17- De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res* 2009; **88**: 1101-1106.
- 18- - De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci* 2010; **118**: 494-501.
- 19- Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. Effect of chlorhexidine incorporation into a self-etching primer on dentine bond strength of a luting cement. *J Dent* 2010; **38**: 496-502.
- 20- Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater* 2008; **24**: 1391-1399.
- 21- Cadenaro M, Antonioli F, Codan B, Agee K, Tay FR, Dorigo Ede S, Pashley DH, Breschi L. Influence of different initiators on the degree of conversion of experimental adhesive

blends in relation to their hydrophilicity and solvent content. *Dent Mater* 2010; **26**: 288-94.

22- Botelho MG. Compressive strength of glass ionomer cements with dental antibacterial agents. *SADJ* 2004; **59**: 51–53.

23- Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials* 2004; **25**: 5423–5431.

24- Anusavice KJ, Zhang NZ, Shen C. Controlled release of chlorhexidine from UDMA-TEGDMA resin. *J Dent Res* 2006; **85**: 950–954.

25- Asmussem E, Peutzfeldt A. The influence of relative humidity on the effect of dentin bonding systems. *J Adhes Dent* 2001; **3**: 123–127.

26- Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SC, Yiu CK. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res* 2003; **82**: 537–541.

27- Reis A, Grande RH, Oliveira GM, Lopes GC, Loguercio AD. A 2-year evaluation of moisture on microtensile bond strength and nanoleakage. *Dent Mater* 2007; **23**: 862–870.

28- Urabe I, Nakajima S, Sano H & Tagami J. Physical properties of the dentin-enamel junction region. *Am J Dent* 2000; **13**: 129-135.

29- Oliver WC & Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mat Res* 1992; **7**: 1564-1583.

30- de Castro FL, de Andrade MF, Duarte Junior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent* 2003; **5**: 129-138.

31- Soares CJ, Pereira CA, Pereira JC, Santana FR, do Prado CJ. Effect of chlorhexidine application on microtensile bond strength to dentin. *Operative Dentistry* 2008; **33**: 183-188.

32- Zhou J, Tan J, Yang X, Xu X, Li D, Chen L. MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. *J Adhes Dent* 2011; **13**: 111-115.

- 33- Nerurkar MJ, Zentner GM, Rytting JH. Effect of chloride on the release of chlorhexidine salts from methyl methacrylate-2-hydroxyethyl methacrylate copolymer reservoir devices. *J Control Release* 1995; **33**: 357–363.
- 34- Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, Carvalho RM, Tjäderhane L, Looney S, Wimmer C, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater* 2010; **26**: 771-778.
- 35- Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, Tjäderhane L, Tay FR, Agee K, Pashley DH. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater* 2010; **26**: 779-785.
- 36- Wilson SJ, Wilson HJ. The release of chlorhexidine from modified dental acrylic resin. *J Oral Rehabil* 1993; **20**: 311-319.
- 37- Riggs PD, Braden M, Patel M. Chlorhexidine release from room temperature polymerising methacrylate systems. *Biomaterials* 2000; **21**: 345-351.
- 38- Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young LA. Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials* 2005; **26**: 7145–7153.
- 39- Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater* 2006; **22**: 211-222.
- 40- Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007; **28**: 3757-3785.

Table 1 – Adhesive systems, batch number, composition and application mode.

Adhesive systems/batch number	Composition	Mode of application
XP Bond (XP - Denstply) 0804002271	TCB-resin, Butyl alcohol, PENTA, PPD, UDMA, TEGDMA, HEMA, modified carboxylic acid and dimethacrylate	1. Apply phosphoric acid to dentin for 15 s; 2. Rinse for 15 s. Dry with absorbent paper. Keep dentin wet. 3. Apply the adhesive for 20 s undisturbed. 4. Gently air for 5 s to evaporate the solvent. 5. Light cure for 20 s.
Ambar (AM - FGM Prod. Odontológicos) 200910	Methacrylate monomers (UDMA and MDP), photoinitiators, co-initiators, stabilizers, inert silica nanoparticles and ethanol	1. Apply phosphoric acid to dentin for 15 s; 2. Rinse for 15 s. Dry with absorbent paper. Keep dentin wet. 3. Apply two coats vigorously by rubbing the adhesive for 20 s (10 s each) 4. Gently air for 10 s to evaporate the solvent. 5. Light cure for 10 s.

(*) TCB-resin: TCB: butan-1,2,3,4-tetracarboxylic acid di-2-hydroxyethylmethacrylate ester; PENTA: dipentaerythritol pentaacrylate monophosphate; PPD: fenilpropanodiona; UDMA: urethane dimethacrylate or 1,6-di(methacryloyloxyethylcarbamoyl)-3,30,5-trimethylhexaan; TEGDMA: triethyleneglycol dimethacrylate, HEMA: 2-hydroxyethyl methacrylate; 10-MDP: 10-methacryloyloxydecyl dihydrogenphosphate.

Table 2 – Number and percentage of specimens (%) according to fracture pattern mode from each experimental condition (*).

Groups	Ambar			XP-Bond		
	A/M	C	PF	A/M	C	PF
0 (Control)	26 (78)	2 (7)	5 (15)	26 (67)	10 (25)	3 (8)
0.01% CHX	25 (71)	2 (12)	6 (17)	24 (70)	6 (17)	4 (13)
0.05% CHX	25 (73)	5 (15)	4 (12)	28 (78)	4 (11)	4 (11)
0.1% CHX	27 (75)	3 (8)	6 (17)	23 (64)	8 (22)	5 (14)
0.2% CHX	32 (90)	2 (5)	2 (5)	24 (67)	7 (19)	4 (14)

(*) A/M – adhesive/mixed fracture mode; C – cohesive fracture mode; PF – premature failures

Table 3 – Overall means and standard deviations of microtensile bond strength (MPa) and nanoleakage (%)obtained in each experimental condition and the statistical significance (*).

CHX concentration	μ TBS (MPa)		Nanoleakage (%)	
	Ambar	XP Bond	Ambar	XP Bond
0 (control)	52.4 $\pm$ 4.9 A	64.5 $\pm$ 2.8 a	14.1 $\pm$ 2.4 ^A	16.0 $\pm$ 2.6 ^a
0.01%	46.9 $\pm$ 3.8 A	61.9 $\pm$ 5.9 a	14.7 $\pm$ 1.6 ^A	16.6 $\pm$ 3.1 ^a
0.05%	47.5 $\pm$ 3.5 A	62.7 $\pm$ 3.1 a	14.6 $\pm$ 2.4 A	16.6 $\pm$ 2.7 a
0.1%	50.5 $\pm$ 2.1 A	66.9 $\pm$ 4.2 a	14.2 $\pm$ 1.8 ^A	16.0 $\pm$ 2.2 ^a
0.2%	50.3 $\pm$ 1.3 A	67.3 $\pm$ 2.6 a	14.5 $\pm$ 2.5 ^A	15.9 $\pm$ 2.9 ^a

(*) Groups identified with the same uppercase (Ambar) or lowercase letters (XP Bond) are not significantly different (Tukey's test, $p > 0.05$). Comparisons are only valid for each column.

Table 4 – Means and standard deviations of nanohardness (GPa) and young's modulus (GPa) from hybrid layer obtained in each experimental condition, as well as the statistical significance (*).

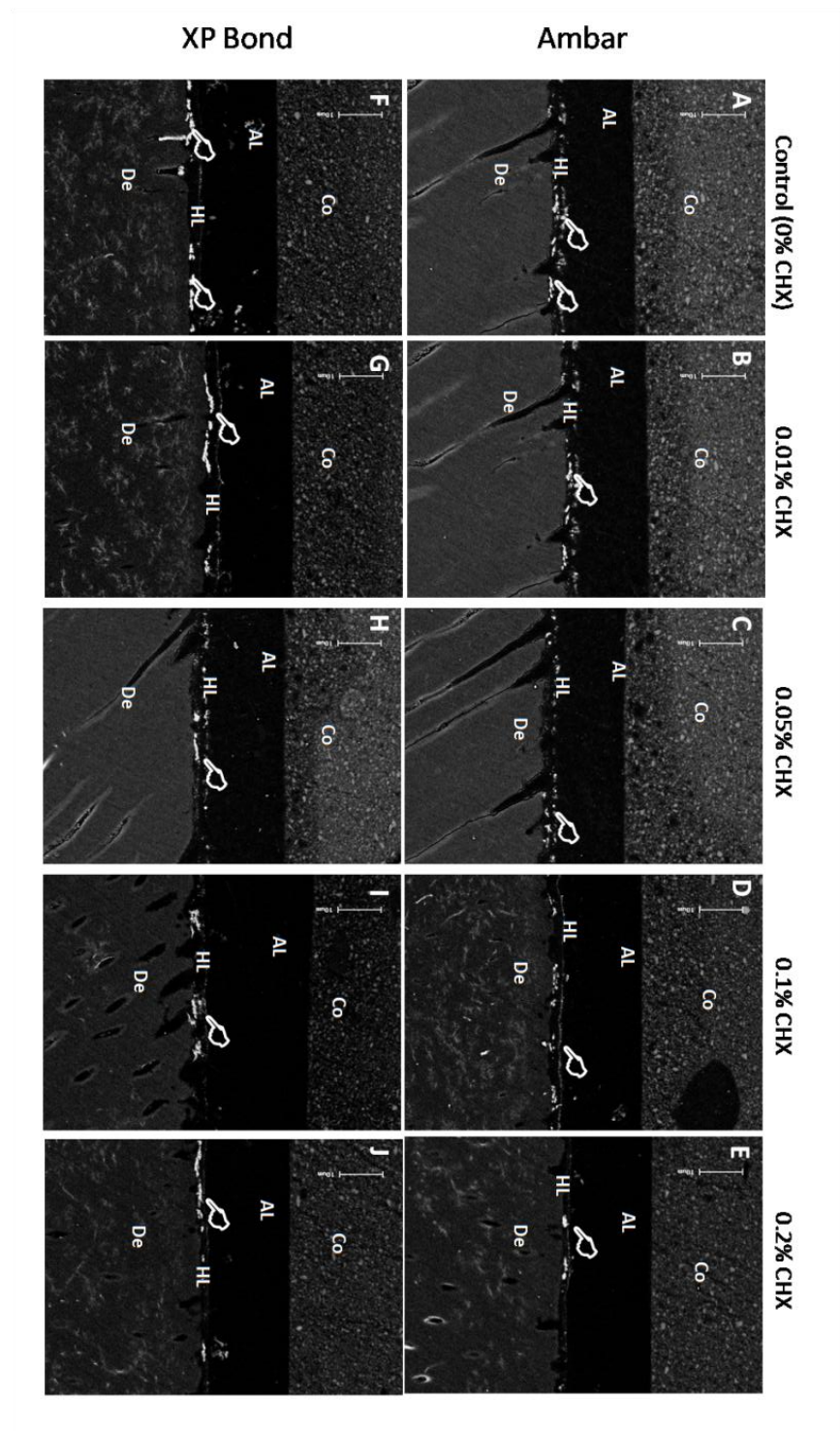
CHX concentration	Nanohardness (GPa)		Young's modulus (GPa)	
	Ambar	XP Bond	Ambar	XP Bond
0 (control)	0.14±0.1 A,B	0.21±0.2 a	2.8±0.2 ^A	3.3±0.6 ^a
0.01%	0.13±0.4 B	0.19±0.3 a	2.6±0.1 ^A	3.0±0.5 ^a
0.05%	0.17±0.1 A	0.22±0.3 a	2.6±0.4 A	2.9±0.4 a
0.1%	0.16±0.4 A	0.22±0.2 a	2.7±0.8 ^A	3.3±0.8 ^a
0.2%	0.13±0.9 B	0.19±0.1 a	2.8±0.1 ^A	3.2±0.5 ^a

Groups identified with the same uppercase (Ambar) or lowercase letters (XP Bond) are not significantly different (Tukey's test, $p > 0.05$). Comparisons are only valid for each column.

Table 5 – Means and standard deviations of nanohardness (GPa) and young's modulus (GPa) from adhesive layer obtained in each experimental condition, as well as the statistical significance (*).

CHX concentration	Nanohardness (GPa)		Young's modulus (GPa)	
	Ambar	XP Bond	Ambar	XP Bond
0 (control)	0.34±0.03 A	0.29±0.02 a	7.8±0.4 ^A	6.5±0.4 ^a
0.01%	0.35±0.04 A	0.30±0.04 a	7.5±0.5 ^A	6.4±0.3 ^a
0.05%	0.32±0.05 A	0.32±0.04 a	7.3±0.4 ^{A,B}	6.2±0.5 ^{a,b}
0.1%	0.36±0.03 A	0.28±0.03 a	6.9±0.5 ^B	6.0±0.4 ^{a,b}
0.2%	0.36±0.05 A	0.30±0.02 a	6.8±0.3 ^B	5.9±0.3 ^b

Groups identified with the same uppercase (Ambar) or lowercase letters (XP Bond) are not significantly different (Tukey's test, $p > 0.05$). Comparisons are only valid for each column.



Legends of the Figure 1- Backscattering SEM micrographs of the adhesive interfaces of the experimental groups. In all groups one can detect the presence of silver nitrate deposits (white hands) mainly within the hybrid layer. (Co = composite resin; AL = adhesive layer; HL = hybrid layer; De = dentin).

Dear Mr. Grande,

Your submission entitled "Modeling of MMP-inhibitor release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives" has been received by the Journal of Dentistry.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jjod/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Julie Millard
Journal Manager
Journal of Dentistry

Modeling of MMP-inhibitor release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives

Rodrigo Stanislawczuk¹ [DDS, MS], Alessandra Reis² [DDS, PhD], Pamela Malaquias³, Fabiane Pereira³, Paulo Vitor Farago⁴ [BPharm, MS, PhD], Alessandro Dourado Loguercio² [DDS, MS, PhD]

¹ Graduate student, Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa and Adjunctive Professor, Department of Restorative Dentistry, Center of Higher Education of Campos Gerais, Ponta Grossa, Brazil.

² Adjunctive Professors, Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

³ Undergraduate student, School of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

⁴ Adjunctive Professor, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

Running title: Chlorhexidine release from adhesives

Corresponding Author:

Alessandro D. Loguercio

Universidade Estadual de Ponta Grossa – Pós Graduação em Odontologia, Rua Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M, Sala 64A – Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, 84030-900; e-mail: aloguercio@hotmail.com

Modeling of drug release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives

Objectives. Evaluated the effects of chlorhexidine (CHX) addition in different concentrations in simplified etch-and-rinse adhesives on water sorption (WS), solubility (SO) and the rate of CHX release (CHXR) over time.

Methods. CHX diacetate were added to Ambar [AM] (FGM) and XP Bond [XP] (Dentsply) in concentrations of 0, 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2 wt%. Disks were prepared into a mold. Specimens were weighed and then stored in water for evaluation of WS and SO over a 28-day period. For CHXR, spectrophotometric measurements of storage solution were performed to examine CHXR kinetics. After a 28-day period, WS, SO, and the cumulative CHXR were obtained. Data were subjected to a two-way ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

Results. XP Bond adhesive showed significantly more WS and SO than Ambar and in general the addition of CHX did not alter WS and SO of the adhesives. XP showed a higher release of CHX than AM ($p < 0.05$) in all concentrations and the final amount of CHX released was directly proportional to the initial CHX concentration added to the adhesives. After 28 days, approximately 20% of CHX was released from XP and 8.0 to 12.0% from AM.

Conclusions: Addition of CHX to commercial adhesive is a feasible method to provide a controlled release of CHX over time without jeopardizing WS and SO of the adhesives.

Significance. Manufactures should consider the addition of CHX to commercial adhesives in an aim to increase the lifetime of resin-dentin bonds.

Key words: Adhesives systems, chlorhexidine, water sorption, solubility, chlorhexidine release.

Introduction

Biodegradation of resin-bonded interfaces has been focus of recent studies. The exact mechanism responsible for the degradation of the hybrid layer has not been completely understood yet. However, it seems that the first stage of biodegradation involves extraction of the resins that had infiltrated the dentin matrix via water-filled nanometer-sized voids followed by the host-derived enzymatic attack of the exposed collagen fibrils.^{1,2}

The role of host-derived enzymes on depletion of collagen fibrils was first demonstrated by Pashley et al.³ by assaying the collagenolytic activity of mineralized dentin powder. The authors³ demonstrated an intrinsic collagenolytic activity in human mineralized dentin, exerted by host-derived dentin metalloproteinases (MMPs), which had been previously demonstrated to be potentially expressed in the dentin-pulp complex.⁴⁻⁶

Since then, several studies have focused their investigations on the use of MMP inhibitors to prolong the durability of the resin dentin bonds. The use of 2% chlorhexidine digluconate (CHX) for 60 s as a preliminary dentin treatment after acid-etching has been claimed to reduce interfacial aging over time, by inhibiting the activation of endogenous MMPs⁷⁻⁹. This procedure, however, adds another step to the bonding protocol, which is in contrast to the clinician's need for simplification.

More simplified protocols, with the use of low concentrated CHX solutions, reduced application times¹⁰⁻¹⁴ and CHX incorporation into the acid etch gel^{12,14} have been

employed successfully to preserve the stability of the resin-dentin bonds after 6 to 12 months^{10,12,13,15}. This medium-term efficacy of CHX has been attributed to its substantivity,^{16,17} since large amounts of CHX remain bound to partially and completely demineralized dentin incubated in saline solution for at least 8 weeks¹⁶.

On the other hand, when the same interfaces treated with CHX are evaluated in longer periods of time, i.e., such as 18-24 months, slight and progressive signals of hybrid layer degradation can be seen^{10,12,13,15}. This may be attributed to the fact a CHX reservoir is not produced and they may be leached out from the hybrid layer. We hypothesize that the any approach that could provide this controlled release of CHX around collagen fibrils could extend even more the life expectancy of resin–dentin adhesive restorations by slightly transferring CHX to adjacent collagen^{17,18}.

The inclusion of CHX into primers and/or adhesives could produce a reservoir for controlled release. Earlier studies that added CHX in primers and/or adhesives and investigated the durability of the resin-dentin bonds have shown controversial conclusions¹⁹⁻²². This is likely due to the fact that this alternative seems to be dependent on the concentration of CHX added to the adhesive formulation^{19,21,22} as well as the chemical compositions of the adhesives to which CHX was included, which deserves further evaluations.

The kinetics of such CHX release from CHX-containing commercial adhesives is poorly known yet, as well as the influence of CHX concentration on such property. So far, only one study investigated the profile of CHX release from adhesives, but non-solvated

experimental adhesives with varied hydrophilicity were employed ²³. Therefore this in vitro study was designed to investigate the water sorption, solubility and CHX release kinetics from two commercial simplified etch-and-rinse adhesive systems after addition of different amounts of CHX diacetate.

Materials and methods

Formulation of the experimental adhesives

The experimental adhesive resins from the present study were formulated by using the simplified etch-and-rinse adhesive systems XP Bond [XP] (Dentsply, York, PA, USA) and Ambar [AM], (FGM Prod. Odont. Ltda, Joinville, SC, Brazil). Detailed composition, mode of application and batch number of the adhesives are depicted in Table 1. Five experimental adhesive systems were formulated according to the addition of different concentrations of CHX diacetate (99.9% pure, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) (wt%): 0 (control, commercial material), 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2%. The CHX was added to the resin and mechanically mixed by a motorized mixer (stirring).

Water sorption (WS) and solubility (SO)

Ten resin disks of each material were produced in a brass mold (5.8 mm diameter, 0.8 mm thick). The liquid adhesive was directly dispensed to completely fill the mould. All visible air bubbles trapped in the adhesives were carefully removed. Then, the solvent evaporation was performed with an air stream for 40 s at a distance of 10 cm.

A glass cover slip was placed on top of the adhesive, which was light-cured for 40 s using a LED light source operated at 1200 mW/cm^2 (Radii-cal, SDI, Bayswater, Victoria, Australia). With the adopted energy density (4.8 J/cm^2) specimens allowed removal from the brass mold without undergoing permanent deformation.

WS and SO were determined according to the ISO specification 4049²⁴, except for specimens' dimensions. Immediately after polymerization, the specimens were placed in a desiccator and transferred to a pre-conditioning oven at 37 °C and left undisturbed for 5 days. After this period, specimens were repeatedly weighed after 24 h intervals until a constant mass (m_1) was obtained (*i.e.*, variation was less than 0.2 mg in any 24 h period). Thickness and diameter of the specimens were measured using a digital caliper, rounded to the nearest 0.01 mm, and these measurements were used to calculate the volume (V) of each specimen (in mm³).

They were then individually placed in sealed eppendorfs containing 10 mL of distilled water (pH 7.2) at 37 °C. After fixed time intervals of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 and 28 s of storage, the eppendorfs were removed from the oven and left at room temperature for 30 min. The specimens were washed in running water, gently wiped with a soft absorbent paper, weighed in an analytical balance (m_2) and returned to the vials containing 10mL of fresh distilled water. After the 28-day storage time, the specimens were dried in a desiccators containing fresh silica gel in an oven at 37 °C and left undisturbed for 10 days. They were weighed daily until a constant mass (m_3) was obtained (as previously described). The initial mass determined after the first desiccation process (m_1) was used to calculate the change in mass after each fixed time interval, during the 28 days of storage in water. Changes in mass were plotted against the storage time in order to obtain the kinetics of water sorption during the entire period of water storage.

WS and SO over the 28 days of water storage were calculated using the following formulae: $WS = (m_2 - m_3)/V$ and $SL = (m_1 - m_3)/V$

Analysis of chlorhexidine (CHX) release

A series of standard solutions containing 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 µg/mL CHX diacetate was used to obtain an analytical curve with a linear regression between absorbance values and CHX concentrations by a spectrophotometric method (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific, Madison, WI, USA). The maximum absorbance peak of CHX was confirmed at 260 nm.

Ten new resin disks of each material were produced as described for WS and SO tests. Specimens were individually stored in deionized water and at appropriate time intervals (1, 3 and 12 h and 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 21, 28 and 180 days), the absorbance values of these storage solutions were obtained at 260 nm and converted to the quantities of CHX released based on the previously prepared linear analytical curve. Thus, the UV absorbance value at 260 nm of controls (0% CHX discs) was subtracted from those produced from CHX-incorporated discs considering the concomitant monomer release. The cumulative release was obtained for 28-day period and was represented in two ways: as percentage of CHX released and as the mass (mg) of CHX release per gram of the sample^{23,25}.

Analysis of release behavior

The cumulative profiles of CHX released from resin discs were investigated by mathematical models^{26,27} (Beck et al., 2005; Schaffazick et al., 2006) using the MicroMath Scientist™ 2.01 software (Salt Lake City, UT, USA) in order to evaluate the CHX release behavior. Data were tested to fit first-order, biexponential, zero-order, weibull and monolag equations (Table 2). The best fit was chosen considering the correlation coefficient (r), the model selection criteria (MSC) and graphical adjustment. MathWorks Matlab™ R2012a software (Natick, MA USA) was used to obtain the time interval required to attain a 50% release of CHX.

In order to have some insight into the CHX release mechanism, a very simple and semi-empirical equation to describe drug release from polymeric systems, the power law (Korsmeyer-Peppas model: $ft = a.t^n$), was also used²⁸. In this equation, ft is the CHX dissolved fraction at time t , n is the release exponent, indicative of the mechanism of the substance release and a is the constant incorporating structural and geometric features of the resin disc.

Statistical analysis

The means and standard deviations of WS, SO and CHX-release (% and in mg/g) were calculated for all experimental conditions. The 28-day data from each adhesive were analyzed by two-way ANOVA using the adhesive and CHX concentration as the main factor. Post hoc multiple comparisons were performed using Tukey's test. Statistical significance was preset at $\alpha = 0.05$. Additionally, the correlation between WS and the

cumulative release of CHX for the CHX-containing adhesives was evaluated by means of linear regression analysis ($\alpha = 0.05$).

Results

Water sorption (WS) and Solubility (SO)

The interaction between adhesive vs. CHX concentration was statistically significant ($p = 0.004$), as well as the main factors ($p < 0.00001$ and $p = 0.002$, respectively). Although some small variations could be detected among WS for the different CHX concentrations added to XP Bond, the effect of adhesive seemed to be much more preponderant. XP Bond adhesive showed significantly more WS than Ambar ($p < 0.00001$) (Table 3 and Figure 1). The addition of CHX did not alter the WS of the Ambar adhesive (Table 3; $p > 0.05$). Significant differences were observed between adhesives ($p < 0.0001$) but not for CHX concentration ($p = 0.42$) and the cross-product interaction ($p = 0.54$). Again, the XP-Bond showed a higher solubility than Ambar (Table 3).

Release behavior of CHX from adhesives

The analytical curve with a linear regression between absorbance values and CHX concentrations had a correlation coefficient of $r = 0.99959$. The release profiles were fitted to mathematical models and the selection of the best model considered the correlation coefficient (r), the model selection criteria (MSC) and the graphic adjustment. Considering all samples, CHX release was best fitted to the biexponential equation than other models. The burst release apparent rate constant (α) and the slow release apparent

rate constant (β) for CHX release are reported in Table 4. The release rates of CHX are summarized in Figures 2 and 3.

The overall cumulative release of CHX (% and mg/g) for all experimental conditions is depicted in Table 5. The statistical analysis of the cumulative % of CHX revealed significant differences between adhesive ($p < 0.0001$) but not for CHX concentration ($p = 0.11$), and the cross-product interaction ($p = 0.34$). On the other hand, when the statistical analysis of the cumulative mg/g of CHX was run, significant differences were observed for the main factors adhesive ($p < 0.0001$) and CHX concentration ($p = 0.001$). This means that XP Bond showed a higher release of CHX than Ambar ($p < 0.05$) in all concentrations and means that although the profile of CHX was similar for all CHX concentrations, the final amount of CHX released was directly proportional to the initial CHX concentration added to the adhesives.

By the performed test, CHX-incorporated XP Bond specimens released almost 20% of the incorporated CHX after the 28-day storage period. For Ambar, a slower CHX release was observed. After 28 days, the incorporated CHX released varied from 8.2 to 12.4%. From the 28-day until the 180-day period, a remarkable amount of CHX release was still observed. The cumulative release for Ambar varied from 20.1 to 22.5% and 30.5 to 31.9% to XP Bond. If can be assumed that the experiments continued and that biexponential equation remained as the dominating release mechanism, the time interval to attain a 50% release is approximately 1 yr for XP resin discs and 1.5 yr for AM resin discs.

Concerning the mathematical modeling fitting of the Korsmeyer-Peppas model, XP Bond samples showed n values of 0.27 (0.2% CHX), 0.25 (0.1% CHX), 0.20 (0.05% CHX) and 0.25 (0.01% CHX). For Ambar samples, n values of 0.30, 0.27, 0.38 and 0.30 were obtained respectively for the ascending concentrations of CHX after 28-days.

Regression analysis of the WS data of the two simplified adhesive systems according to their CHX concentration is shown in Figure 4. When the cumulative release in % or mg/g of CHX-containing adhesives was plotted against WS, a significant and positive linear correlation was observed for all conditions ($p = 0.0014$; $r^2 = 0.8396$).

Discussion

All conventional simplified dental adhesives evaluated in this study absorbed significant amounts of water, mainly within the first day of water storage (Figure 1), which is in agreement with previous studies²⁹⁻³¹. This suggests that formulation compromises are made when creating hydrophilic solutions compatible with the moist demineralized dentin. The most commonly used monomers in dental adhesive systems are hydrophilic³² and their resultant polymers are more prone to WS^{29,30} than hydrophobic polymers.

Despite the similar WS kinetics between materials, the amount of WS and SO differed between them. The higher WS of XP Bond is suggestive that this adhesive presents a more hydrophilic behavior than Ambar. Usually, adhesive systems are multi-methacrylate monomers containing cross-linking monomers such as Bis-GMA, UDMA and TEGDMA and mono-methacrylate monomers, with a more hydrophilic behavior³², such as HEMA. Contrary to Ambar, XP Bond contains HEMA which is recognized as being highly

hydrophilic³². HEMA-containing adhesives were shown to present much higher water uptake than HEMA-free adhesives^{29,30}. Besides that, XP Bond also contains PENTA, which is a very hydrophilic resin monomer and may have contributed to the higher WS of this material compared to Ambar. However in spite of these differences, the addition of CHX did not affect the WS and SO of the materials when compared to the respective CHX-free adhesives. In other words, this means that the CHX addition did not make these materials more prone to early degradation.

Although earlier studies demonstrated that the addition of CHX to etch-and-rinse adhesives could lead to higher SO²³, lower degree of conversion and lower modulus of elasticity¹⁸, this was only observed for CHX concentrations higher than 1%. Concentrations lower than 0.2% seems to not affect significantly the WS and SO of experimental adhesives²³ and commercial adhesives as the ones used in the present study.

In general, the amount of CHX release (mg/g) from the experimental 0.2% CHX-containing commercial adhesives in the present study were higher than what had been previously reported for 0.2% CHX-containing experimental adhesives in an earlier study²³. While in the present study we employed solvated, filled, commercial adhesive systems, Hiraishi et al.²³ evaluated a series of unfilled, non-solvated methacrylate-based resins (Bis-GMA/TEGDMA/HEMA). It was already demonstrated that commercial materials usually present more WS and SO^{29,30} than experimental materials from the same category

of adhesive ^{29-31,33} as they exhibit a higher water diffusion coefficient than the non-solvated adhesives ³⁰.

The presence of solvents in commercial adhesives probably leads to the formation of polymer networks with poor packing density or with higher free volume. The retention of solvents in adhesives prevents the formation of a polymer with high ultimate tensile strength ^{18,34-36}. Besides that, this solvent retention increases the permeability of the adhesive layers after polymerization ¹⁸.

In regard to the profile of CHX release, an initial burst release of short duration, probably attributed to the release of CHX presented in the outer surface of CHX-containing adhesives, was observed. This was followed by a longer period of continuous but slower declining release (data not shown) as well as reported by Hiraishi et al ²³. After a 28-day storage period, approximately 20% of the CHX incorporated in the XP Bond adhesive was released. This figure ranged from 8.2 to 12.4% for AM material. This means that the composition of the polymer network plays an important role on the amount of CHX release over time, being the ones with higher WS more prone to release higher amounts of CHX in a shorter period of time. In fact, the positive correlation between the cumulative CHX releases with WS of the experimental CHX-containing adhesives (Figure 4), is indicative that this release occurred simultaneously to swelling within the polymer matrix ^{38,39}. Besides that, the calculation of the release exponents (n) from the mathematical Korsmeyer-Peppas model showed that for all CHX-containing materials, values lower than 0.43 was found, which indicates that main mechanism that govern CHX

release from these adhesives is governed by Fickian diffusion ⁴⁰ during the initial 28-days period. The Fickian diffusion is a diffusional release that occurs by the smooth and systematically molecular movement of a drug from high-concentration areas to low-concentration areas ⁴¹. In brief, water diffuses into the resin disc, CHX is then dissolved and finally the dissolved drug diffuses out of the polymer network ⁴².

If one calculates the total CHX concentration released after 28 days from all CHX-containing adhesives with the data from Table 5 we would face figures of 0.00192 and 0.00083% for XP Bond and Ambar respectively, when 0.01% of CHX was added. These figures were 0.0374 and 0.0236% respectively when 0.2% of CHX was added. The CHX concentrations released from all XP Bond-containing adhesives are at least similar or exceed the concentration that is required to inhibit the activities of MMPs. The minimal concentration of CHX that resulted in complete inhibition of MMP-9 activity was reported to be 0.002%, while MMP-2 activity was inhibited at a CHX concentration as low as 0.0001% ⁴³. CHX concentrations between 0.01 and 0.02% are sufficient to completely inhibit the activities of MMP-8 ⁴³ which was shown to be present in higher amount in the human dentin ⁴⁴.

As mentioned by Hiraishi et al. ²³ the CHX released by the CHX-containing adhesives can be readily diluted when in contact with an external environment (e.g. a gap along the resin–dentin interface) so that after a while, the concentration may be no longer sufficient to exert any appreciable inhibition activity. However, CHX released by these adhesives within the hybrid layers are likely to remain within the interfibrillar spaces due

to the inherent substantivity of the CHX in demineralized and mineralized human dentin^{16,17}.

An intriguing and pertinent question is how long these CHX-containing adhesives may still be capable to provide CHX release in concentrations sufficient to inhibit MMP activity. Based on the biexponential equation described in the materials and methods section we can calculate the length of time for the CHX-containing adhesives to attain 50% of CHX release if one assumes that Fickian diffusion also remained as the dominating release mechanism. The results show that it would take approximately 1 yr and 1.5 yr years for the XP Bond and Ambar, respectively to release 50% of the added CHX.

It is hoped that this slow, controlled-release of CHX from these adhesives surrounding collagen fibrils in the hybrid layer may extend the life expectancy of resin–dentin adhesive restorations by transferring CHX from the resin to adjacent collagen. However long-term investigation of the resin-dentin bonds by means of microtensile bond strength test should be conducted and compared to the conventional aqueous CHX digluconate application in the demineralized dentin.

It is known that when formulating CHX-containing adhesive dental materials, compromises are made to provide sufficient drug release, but without lowering bonding efficacy to tooth structure and impairing physical property. The results of this study provide body of evidence that the addition of CHX in concentrations up to 0.2% to the commercial etch-and-rinse adhesives is a feasible technique to provide controlled release of CHX in sufficient concentration to inhibit the MMP activity over time without jeopardizing the WS and SO of the materials.

However, due to several differences between commercial adhesives available in the market ³², this CHX addition should be individually as the varied chemistry formulation of bonding resins may have a profound effect on the stability of the CHX molecules into solution.

CONCLUSIONS

Within the limitations of this in vitro study, one may conclude that the addition of CHX to commercial adhesive is a feasible method to provide controlled release of CHX over time without jeopardizing the water sorption and solubility of the adhesives.

References

1. Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *Journal of Dental Research* 2006; **85**:11-4.
2. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Annals of Biomedical Engineering* 2010; **38**:1989-03.
3. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal Dental Research* 2004; **83**:216-21.
4. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *Journal Dental Research* 2001; **80**:1545-9.
5. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *Journal Dental Research* 2002; **81**:603-7.
6. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *Journal Dental Research* 1998; **77**:1622-9.
7. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *Journal Dental Research* 2005; **84**:741-6.
8. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *Journal Dental Research* 2007; **86**:529-33.
9. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Operative Dentistry* 2007; **32**:107-11.
10. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *Journal Adhesive Dentistry* 2009; **11**:191-8.
11. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *European Journal Oral Science* 2009; **117**:587-96.
12. Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. *Operative Dentistry* 2009; **34**:481-90.
13. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dental Materials* 2010; **26**:320-5.

14. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *Journal of Dentistry* 2011; **39**:40-7.
15. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res* 2010; **89**:1499-04.
16. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dental Materials* 2010; **26**:779-85.
17. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dental Materials* 2010; **26**:771-8.
18. Cadenaro M, Pashley DH, Marchesi G, Carrilho M, Antonioli F, Mazzoni A, et al. Influence of chlorhexidine on the degree of conversion and E-modulus of experimental adhesive blends. *Dental Materials* 2009; **25**:1269-74.
19. Zhou J, Tan J, Chen L, Li D, Tan Y. The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. *Journal of Dentistry* 2009; **37**:807-12.
20. Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L. Effect of chlorhexidine application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. *Journal Adhesive Dentistry* 2010; **12**:27-31.
21. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *Journal Dentistry Research* 2009; **88**:1101-6.
22. De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Enzymatic degradation of adhesive–dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *European Journal of Oral Science* 2010; **118**:494-501.
23. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dental Materials* 2008; **24**:1391-9.
24. International Standard Organization 4049. Dentistry: resin based dental fillings. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2000.
25. Riggs PD, Braden M, Patel M. Chlorhexidine release from room temperature polymerising methacrylate systems. *Biomaterials* 2000; **21**:345-51.
26. Beck RCR, Pohlmann AR, Benvenutti EV, Dalla Costa T, Guterres SS. Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: preparation, morphological characterization, in vitro release and in vivo gastrointestinal tolerance. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2005; **16**: 1233-40.
27. Schaffazick SR, Pohlmann AR, Mezzalira G, Guterres SS. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2006; **17**:562-9.

28. Raffin RP, Colomé LM, Haas SE, Jornada DS, Pohlmann AR, Guterres SS. Development of HPMC and Eudragit S100 blended microparticles containing sodium pantoprazole. *Pharmazie* 2007; **62**:361-4.
29. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials* 2005; **26**:6449-59.
30. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dental Materials* 2006; **22**:973-80.
31. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Influence of water-storage time on the sorption and solubility behavior of current adhesives and primer/adhesive mixtures. *Operative Dentistry* 2007; **32**:53-59.
32. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007; **28**: 3757-85.
33. Fabre HS, Fabre S, Cefaly DF, de Oliveira Carrilho MR, Garcia FC, Wang L. Water sorption and solubility of dentin bonding agents light-cured with different light sources. *J Dent.* 2007 Mar;35(3):253-8.
34. Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *Journal of Dentistry* 1999; **27**:209-14.
35. Dickens SH, Cho BH. Interpretation of bond failure through conversion and residual solvent measurements and Weibull analyses of flexural and microtensile bond strengths of bonding agents. *Dental Materials* 2005; **21**:354-64.
36. Bae JH, Cho BH, Kim JS, Kim MS, Lee IB, Son HH, et al. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. *Journal Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 2005; **74**:822-8.
37. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *European Journal of Oral Science* 2005; **113**:525-30.
38. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Critical Reviews Oral Biology and Medicine* 2001; **12**:136-51.
39. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dental Materials* 2006; **22**:211-22.
40. Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advance drug Delivery Reviews* 2001; **11**:139-57.
41. Florence AT, Attwood D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. 4th ed. London, Pharmaceutical Press, 2005.

42. Manadas R, Pina ME, Veiga F. Dissolution Studies *in vitro* as a Prognostic Tool for Oral Absorption of Modified Release Pharmaceutical Dosage Forms. *Brazilian Journal of pharmaceutical Sciences* 2002; **38**:375-99.
43. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 1999; **6**:437-9.
44. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Archives of Oral Biological* 2007; **52**:121-7.

Table 1 – Adhesive systems, composition and batch number.

Adhesive systems	Composition	Bach number
XP Bond (XP - Denstsply)	TCB-resin, Butyl alcohol, PENTA, PPD, UDMA, TEGDMA, HEMA, modified carboxylic acid, nanofiller and dimethacrylate	0804002271
Ambar (AM - FGM Prod. Odontológicos)	Methacrylate monomers (UDMA and MDP), photoinitiators, co-initiators, stabilizers, inert silica nanoparticles and ethanol	200910

(*) TCB-resin: TCB: butan-1,2,3,4-tetracarboxylic acid di-2-hydroxyethylmethacrylate Ester; PENTA: dipentaerythritol pentaacrylate monophosphate; PPD: fenilpropanodiona; UDMA: urethane dimethacrylate or 1,6-di(methacryloyloxyethylcarbamoil)-3,30,5-trimethylhexaan; TEGDMA: triethyleneglycol dimethacrylate, HEMA: 2-hydroxyethyl methacrylate; 10-MDP: 10-methacryloyloxydecyl dihydrogenphosphate.

Table 2 - Mathematical models related to the dissolution experiments.

Model	Equation
First-order	$\%D = 100(1 - e^{-kt})$
Biexponential	$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Zero-order	$\%D = kt$
Weibull	$\%D = 100[1 - e^{-(t/TD)^b}]$
Monolag	$\%D = 100[1 - e^{-k(t-x)}]$
<i>%D = dissolved percentage, b = shape parameter, TD = time interval necessary to release 63.2% of the drug, k, α and β = kinetics constants, t = dissolution time, A and B = initial drug concentrations that contribute for the two dissolution stages.</i>	

Table 3 - Water sorption and solubility ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) of experimental conditions at the 28-day storage period.

Adhesive	Concentration (%)	Water sorption ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	Solubility ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)
XP-Bond	0 (control)	338.6 $\pm$ 38.5 A,B	238.5 $\pm$ 23.7 a
	0.01	360.6 $\pm$ 40.8 A	236.3 $\pm$ 34.5 a
	0.05	275.1 $\pm$ 24.4 B	207.7 $\pm$ 23.7 a
	0.1	298.9 $\pm$ 36.8 A,B	228.1 $\pm$ 32.1 a
	0.2	346.6 $\pm$ 35.7 A,B	252.4 $\pm$ 34.4 a
Ambar	0 (control)	172.6 $\pm$ 36.4 C	63.3 $\pm$ 15.1 b
	0.01	167.8 $\pm$ 33.4 C	71.6 $\pm$ 19.8 b
	0.05	207.5 $\pm$ 38.9 C	54.2 $\pm$ 30.2 b
	0.1	183.9 $\pm$ 22.1 C	56.4 $\pm$ 19.2 b
	0.2	176.7 $\pm$ 23.2 C	56.1 $\pm$ 16.4 b

Analysis per column: Values are means (S.D.), n = 10 (per group). Same uppercase letters for water sorption and lower case letter for solubility indicate no statistically significant difference ($p > 0.05$).

Table 4 - Release data obtained by fitting the CHX profiles of resin discs to the biexponential equation.

Adhesive	Concentration (%)	Biexponential model (*)			
		MSC	R	α (min ⁻¹)	β (min ⁻¹)
XP	0.01	3.98	0.99	20.55 10 ⁻³	2.92 10 ⁻⁵
	0.05	2.82	0.98	31.26 10 ⁻³	1.99 10 ⁻⁵
	0.1	4.56	0.99	22.83 10 ⁻³	3.87 10 ⁻⁵
	0.2	4.65	0.99	20.62 10 ⁻³	5.22 10 ⁻⁵
Ambar	0.01	4.88	0.99	1.15 10 ⁻³	5.78 10 ⁻⁵
	0.05	4.79	0.99	1.21 10 ⁻³	6.53 10 ⁻⁵
	0.1	3.39	0.98	1.57 10 ⁻³	8.11 10 ⁻⁵
	0.2	3.63	0.99	1.69 10 ⁻³	3.78 10 ⁻⁵

(*) MSC = the model selection criteria; R = correlation coefficient; α and β = kinetics constants

Table 5 – Chlorexidine release in % and mg/g of experimental conditions after 28 days of water storage.

Adhesive	Concentration (%)	Chlorexidine release	
		% of the original concentration	(mg/g)
XP-Bond	0.01	19.2 ± 2.2 A	0.181 ± 0.07 a
	0.05	17.4 ± 0.5 A	0.389 ± 0.05 a
	0.1	19.8 ± 1.2 A	2.176 ± 0.63 b
	0.2	18.7 ± 1.9 A	4.265 ± 0.21 c
Ambar	0.01	8.3 ± 1.6 B	0.00747 ± 0.01 d
	0.05	9.6 ± 0.4 B	0.01684 ± 0.06 e
	0.1	12.1 ± 3.8 B	0.08195 ± 0.05 e,f
	0.2	11.8 ± 1.4 B	0.10549 ± 0.14 f

Analysis per column: Values are means (S.D.), n = 10 (per group). Same uppercase letters for CHX (%) and lower case letter for CHX (mg/g) indicate no statistically significant difference (p > 0.05).

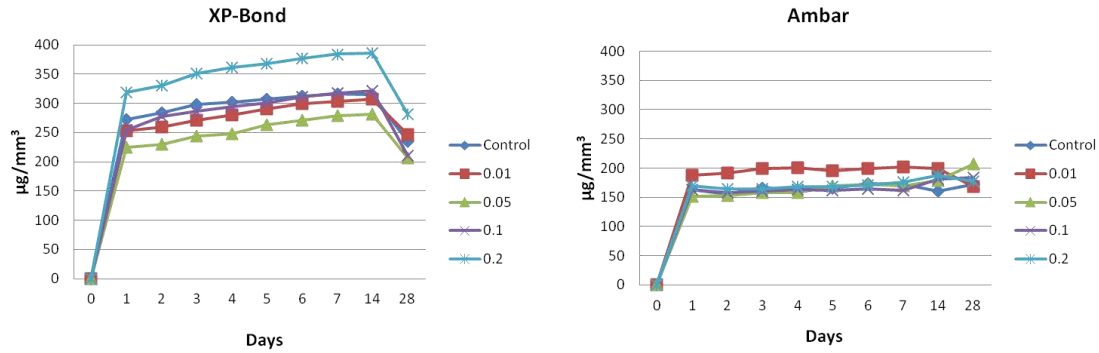


Figure 1 - Changes in water sorption from CHX-containing XP-Bond (left) and Ambar (right) with addition of different % of chlorhexidine (0.01 to 0.2%) over the 28-day of water storage.

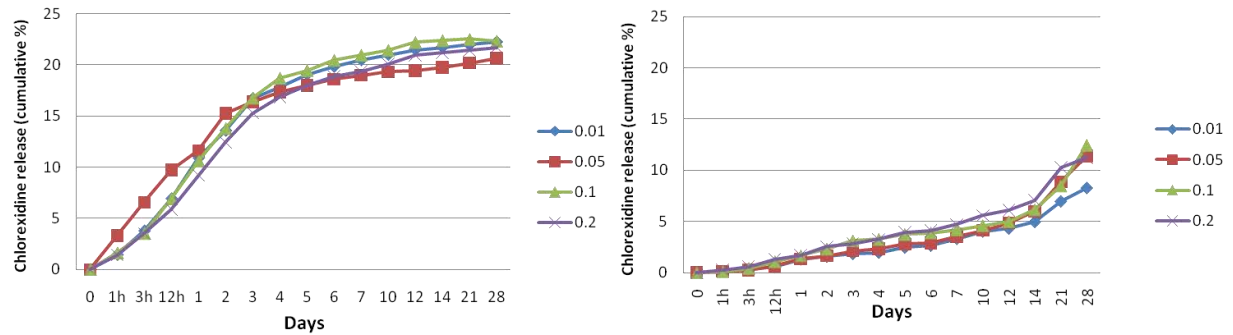


Figure 2 – Chlorhexidine release (cumulative %) from incorporated resin discs of of CHX-containing XP-Bond (left) and Ambar (right) with addition of different % of chlorhexidine (0.01 to 0.2%) over the 28-day of water storage.

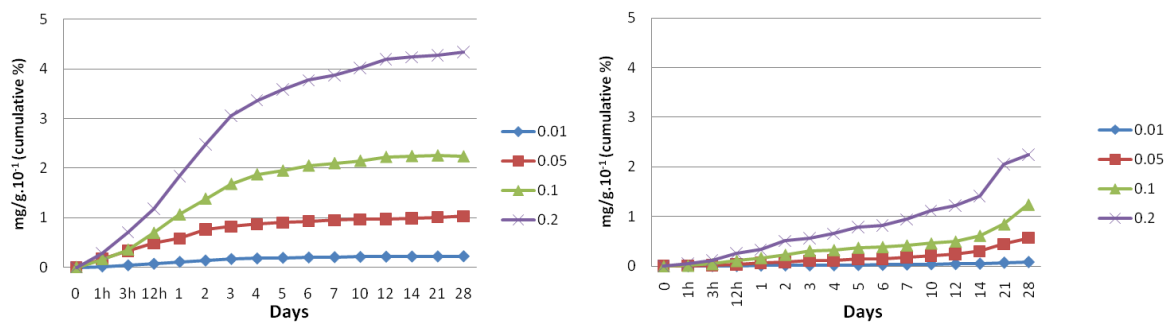


Figure 3 – Chlorhexidine release (cumulative mg/g) from incorporated resin discs of CHX-containing XP-Bond (left) and Ambar (right) with addition of different % of chlorhexidine (0.01 to 0.2%). Observe that, in the case of Ambar, the release was in $\text{mg}/\text{g}^{10^{-1}}$ over the 28-day of water storage.

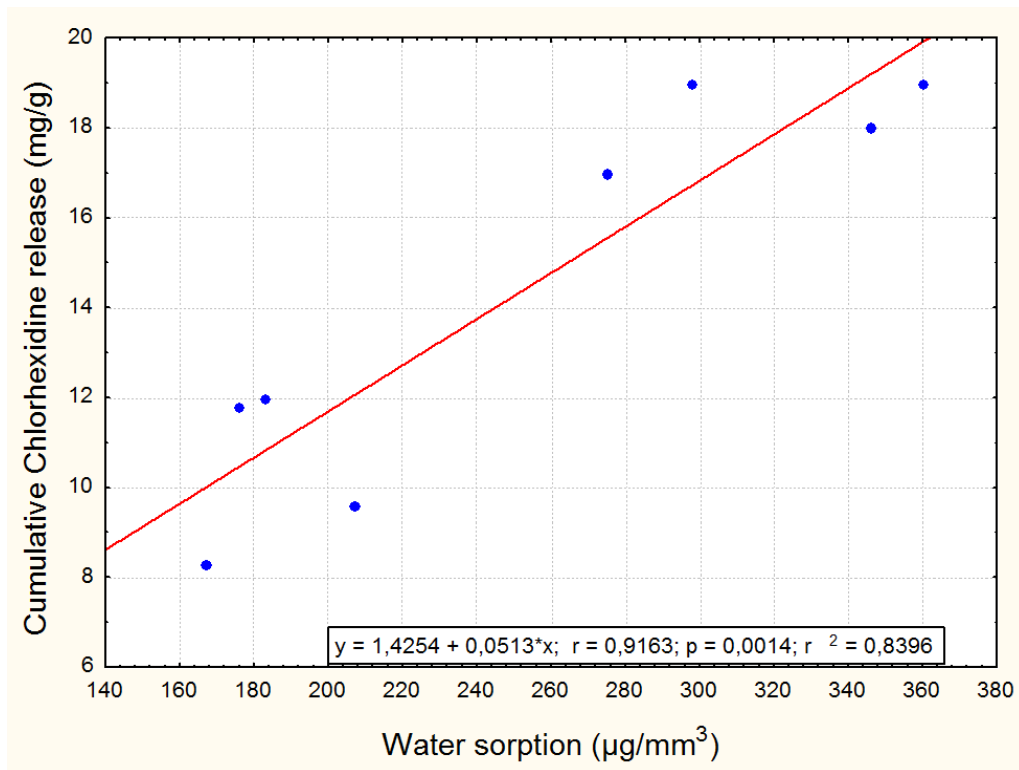


Figure 4 –Regression analyses of the cumulative chlorhexidine release for 28 days (mg/g) against the water sorption (µg/mm³) of each adhe.

From: godoy@amjdent.com
To: aloguercio@hotmail.com
Subject: RE: Article submission
Date: Mon, 23 Oct 2012 09:33:06 -0600

Prof Loguercio:

I received the paper. I will submit it to at least two reviewers for their comments and will contact you immediately after I hear from all of them.

Thank you for considering the ***American Journal of Dentistry*** for possible publication of your work.

Sincerely,

Prof. Dr. Franklin Garcia-Godoy

Editor

P.S. The paper was sent to my address at the University of Tennessee. All submissions should be at the journal address: godoy@amjdent.com

Prof. Dr. Franklin Garcia-Godoy

Editor, ***American Journal of Dentistry***

✉: [1138 N. Germantown Parkway, #360](#)

[Cordova, TN 38018](#)

☎: 901 752-1225 E-✉: godoy@amjdent.com

From: Garcia-Godoy, Franklin [mailto:godoy@uthsc.edu]
Sent: Monday, October 23, 2012 8:30 AM
To: godoy@amjdent.com
Subject: FW: Article submission

Franklin Garcia-Godoy, DDS, MS, PhD

Professor and Senior Executive Associate Dean for Research

College of Dentistry, University of Tennessee Health Science Center

875 Union Avenue, Memphis, TN 38163

Tel: 901 448-6333 | Fax: 901 448-1625 | godoy@uthsc.edu

www.uthsc.edu/dentistry/Research/

From: Alessandro Loguercio [aloguercio@hotmail.com]

Sent: Wednesday, October 23, 2012 5:41 AM

To: Katherine Godoy Managing Editor; Garcia-Godoy, Franklin

Subject: Article submission

Dear Dr. Garcia-Godoy, Editor, American Journal of Dentistry

Attached is the manuscript intituled "**Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin-dentin interfaces**" for the appraisal of the Editorial board of American Journal of Dentistry, as well as, cover letter and copyright statemente signed for ALL authors.

Sincerely yours,

Prof. Dr. Alessandro D. Loguercio, DDS, Ms, PhD

Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin–dentin interfaces

Rodrigo Stanislawczuk^{1,3}, Fabiane Pereira², Miguel Angel Muñoz³, Issis Luque³, Alessandra Reis⁴, Alessandro Dourado Loguercio⁴

¹ Adjunctive Professor, Department of Restorative Dentistry, Center of High Education of Campos Gerais, Ponta Grossa, Brazil;

² Undergraduate student, Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil;

³ Graduate student, Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil;

⁴ Adjunctive Professors, Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

Running title: Chlorhexidine-containing adhesive on bonding durability

Corresponding Author:

Alessandro D. Loguercio

Universidade Estadual de Ponta Grossa – Pós Graduação em Odontologia, Rua Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M, Sala 64A – Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, 84030-900

e-mail: aloguercio@hotmail.com

Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin–dentin interfaces

This study evaluated the effect of diacetate CHX concentration into two simplified etch-and-rinse (ER) adhesive systems on the ultimate tensile strength (UTS) and on the immediate (IM) and 1-year (1Y) resin-dentin bond strength (μ TBS) and nanoleakage (NL). Ten experimental adhesive systems were formulated according to the addition of different concentrations of CHX diacetate (0 [control], 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2%) in the commercial simplified ER Ambar (FGM) and XP-Bond (Dentsply). For UTS (n=10), adhesive specimens were constructed in a hourglass shape metallic matrix (10 mm long, 2 mm wide, and 1 mm deep with cross-sectional area of 0.8 mm^2) and tested in tension at 0.5 mm/min. The occlusal enamel of fifty caries-free extracted molars was removed in order to expose a flat dentin surface and the adhesives were applied after 37% phosphoric acid etching. After composite resin build-ups, specimens were longitudinally sectioned to obtain resin-dentin bonded sticks (0.8 mm^2) to be tested in tension at 0.5 mm/min in the IM or 1Y periods. For NL, 2 bonded sticks from each tooth were coated with nail varnish, placed in the silver nitrate and polished down with SiC paper to be analyzed under scanning electron microscopy. The μ TBS and NL data from each adhesive was submitted to a two-way repeated measured ANOVA while UTS data was analyzed by one-way ANOVA. Tukey's test was used for pairwise comparisons ($\alpha=0.05$). After 1Y, significant reductions of μ TBS and increases of NL were observed for both adhesives in the control group ($p<0.05$). When CHX-containing adhesives were used, reductions of μ TBS over time were not observed (AM) or it was less pronounced than the control (XP); regardless of the CHX concentration, as well as, for NL.

Clinical significance statement: The addition of CHX diacetate in the simplified ER adhesive systems may be an alternative to increase the long-term stability of resin-dentin interfaces without the need for additional steps in the bonding protocol.

Key words: Adhesives systems, chlorhexidine, durability; long-term; nanoleakage, microtensile bond strength

INTRODUCTION

The most important concern regarding contemporary adhesive restorations is their limited durability in vivo^{1,2} which results in millions of dental care dollars spent annually on replacement of these restorations³. Clinically, the most frequently occurrence of bonding failure is the retention loss of adhesive restorations as well as marginal defects, such as lack of marginal adaptation and marginal discoloration^{1,2}.

These clinical concerns are mainly observed with simplified self-etch and etch-and-rinse (ER) adhesive systems^{1,2} as they are more prone to water sorption⁴ and therefore susceptible to the swelling effect of water on the polymer produced after light-curing. However, not only the polymer is susceptible to degradation. Host-derived matrix metalloproteinases [MMPs]⁵ and cysteine cathepsins⁶, activated after adhesive application⁷⁻⁹ has been claimed to degrade the collagen fibrils.

Several approaches to inhibit the activities of these host-derived enzymes were proposed in an aim to prolong the clinical lifetime of bonding interfaces^{8,9}. It was demonstrated that collagen fibrils could be preserved after storage in a solution containing chlorhexidine [CHX], a non-specific synthetic protease inhibitor⁵. This was further confirmed by in vivo studies in deciduous¹⁰ and permanent teeth¹¹. These studies did not observe degradation of the collagen fibrils after application of an aqueous solution of 2% CHX digluconate on acid-etched dentin, before adhesive application^{10,11}.

In spite of the beneficial findings of the use of 2% CHX for 60 s, as a non-rinse primer on etched dentin, this procedure adds an extra step to the bonding protocol, which

is against the clinicians' preference for simplification. In face of that other studies evaluated the impact of CHX incorporation in the acid conditioner^{12,13} or in the adhesive solution¹⁴⁻¹⁷. The CHX inclusion in the phosphoric acid was capable to preserve the resin-dentin degradation after 6 and 24 months of water storage^{12,13}. When it comes to the inclusion of CHX or other proteases inhibitors in primers and/or adhesives, controversial results have been published¹⁴⁻¹⁹. Variations in the amount of CHX concentration and the type of bonding strategy evaluated could be responsible for such variability¹⁴⁻¹⁷.

So far, only one study has evaluated the impact of CHX addition in a simplified ER adhesive¹⁷. The authors did not observe preservation of the resin-dentin microtensile bond strength (μ TBS) which was attributed to the low concentration of CHX (0.05%) added to the bonding solution. Previous studies demonstrated that very low CHX concentrations ranging from 0.2 to 0.002%^{20,21} could prevent dentin bonding degradation; however in these studies CHX was used as a primer on etched-dentin. The incorporation of CHX into the bonding solution likely restricts the availability of this protease inhibitor to the bonded environment by polymer entrapment.

Thus, the optimal concentration of CHX that may be added in the adhesive to produce stable bonds without jeopardizing other mechanical properties of the adhesive layer is yet to be addressed. Therefore, this in vitro study was designed to evaluate the effect of diacetate CHX concentration into two simplified ER adhesive systems on the ultimate tensile strength (UTS) of the adhesive and on the immediate and 1-year resin-dentin μ TBS and nanoleakage (NL). The following null hypotheses were tested: 1) the

different CHX concentrations will not result in differences in the UTS of the two adhesive tested and; 2) the different CHX concentrations will not result in differences in the immediate and 1-year μ TBS and NL of the adhesives.

METHODS AND MATERIALS

Formulation of the experimental adhesives

The experimental adhesives used in the present study were formulated by using the simplified ER adhesive systems XP Bond [XP] (Dentsply, York, PA, USA) and Ambar [AM], (FGM, Joinville, SC, Brazil). Detailed composition, mode of application and batch number of the adhesives are depicted in Table 1.

Ten experimental adhesive systems were formulated according to the addition of different concentrations of CHX diacetate (99.9% pure, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) (wt%): 0 (control), 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2%. The CHX was added to the bonding resin and mechanically mixed by a motorized mixer (stirring).

Teeth preparation and bonding procedures

Fifty caries-free extracted human third molars were used. The teeth were collected after the patient's informed consent. The University Ethics Committee approved this study under protocol number 1693/09. Teeth were disinfected in 0.5% chloramine, stored in distilled water and used within 3 months after extraction. A flat dentin surface was exposed on each tooth after wet grinding the occlusal enamel with 180-grit SiC paper. The enamel-free, exposed dentin surfaces were further polished with # 600-grit silicon-carbide paper for 60 s to standardize the smear layer.

The adhesives were applied as per manufacturers' instructions (Table 1) and they were light cured with a halogen light for 10 s at 600 W/cm² (VIP, Bisco, Schaumburg, IL,

USA). Resin composite blocks (Opallis, FGM) were build-up on the bonded surfaces (3 increments of 1.0 mm each) and were individually light activated for 40 s. All bonding procedures were carried out by a single operator in an environment with controlled temperature and humidity. Five teeth were used for each experimental group.

After storage of the bonded teeth in distilled water at 37°C for 24 h, they were longitudinally sectioned in both “x” and “y” directions across the bonded interface with a diamond saw in a Labcut 1010 machine (Extec Corp., Enfield, CT, USA), under water cooling at 300 rpm to obtain bonded sticks with a cross-sectional area of approximately 0.8 mm². The number of premature failures (PF) per tooth during specimen preparation was recorded. The cross-sectional area of each stick was measured with the digital caliper to the nearest 0.01 mm and recorded for subsequent calculation of the μ TBS (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tokyo, Japan). The bonded sticks originated from the same tooth were randomly divided and assigned to be tested immediately [IM] or after 1 year of storage [1Y] in distilled water at 37°C. The storage solution was not changed and its pH was monitored monthly.

Microtensile bond strength testing (μ TBS)

Each stick were attached to a modified device for μ TBS with cyanoacrylate resin (Super Bonder, Loctite, São Paulo, SP, Brazil) and subjected to a tensile force in a universal testing machine (Kratos, São Paulo, SP, Brazil) at 0.5 mm/min. The failure mode was evaluated at 40X (HMV-2, Shimadzu, Tokyo, Japan) and classified as dentin cohesive (failure exclusive within cohesive dentin - CD); resin cohesive (failure exclusive within

cohesive resin - CR); adhesive (failure at resin/dentin interface – A), or mixed (failure at resin/dentin interface that included cohesive failure of the neighboring substrates, M).

Nanoleakage evaluation (NL)

Two bonded sticks from each tooth at each storage period were coated with two layers of nail varnish applied up to within 1 mm of the bonded interfaces. The bonded sticks were placed in the ammoniacal silver nitrate in darkness for 24 h, rinsed thoroughly in distilled water, and immersed in photo developing solution for 8 h under a fluorescent light to reduce silver ions into metallic silver grains within voids along the bonded interface.

Specimens were mounted on aluminum stubs, polished with a 1000-grit SiC paper and 6, 3, 1 and 0.25 μm diamond paste (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA). Then they were ultrasonically cleaned, air dried and gold sputter coated (MED 010, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) for analysis in a scanning electron microscope operated in the backscattered mode and using energy dispersive X-ray spectrometry (EDX) (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK). The measurement was done in the center of the stick and 0.3 mm left and 0.3 mm right of the center by a technician who was not aware of the experimental conditions under evaluation.

Ultimate Tensile Strength (UTS)

A metallic matrix 10 mm long, 2 mm wide, and 1 mm deep with an hourglass shape was employed for the construction of the bonding resin specimens. After isolating the

matrix, the experimental adhesives were dropped into the mold and then they were gently air-dried oil and water-free compressed air (20 s) to allow for solvent evaporation. Then, a plastic matrix strip was placed on the adhesive and the surface was light-cured for 60 s at 600 W/cm^2 . After 24h of water storage (37°C), each hourglass shape specimen were attached to a modified device with cyanoacrylate resin and subjected to a tensile force at 0.5 mm/min . Ten specimens were prepared for each group.

Statistical analysis

The experimental unit in the current study was the hemi-tooth, since half of the tooth was tested IM and the other half was tested after 1Y of water storage. The μTBS values and percentage of NL of all sticks from the same hemi-tooth were averaged for statistical purposes.

The μTBS (MPa) and NL (%) data of each adhesive were subjected to two-way repeated measures ANOVA. The repeated measure was the hemi-tooth. The UTS (MPa) data of each adhesive were subjected to a one-way ANOVA. Tukey's post hoc test for pair-wise comparisons ($\alpha = 0.05$) using the Statistica for Windows software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

RESULTS

Approximately 22–25 sticks could be obtained per tooth, including those with PF. The mean cross-sectional area ranged from 0.89 to 1.02 mm² and no difference among groups was detected ($p > 0.05$). The percentages of specimens with frequency of each fracture pattern mode are shown in Table 2 and 3. All groups had similar overall distribution of premature failures (around 2-5%) and the other fracture modes.

Microtensile bond strength test

The μ TBS means for the all groups are shown in Table 4. For both adhesives, the cross-product interaction was statistically significant ($p = 0.002$ and $p = 0.001$ for AM and XP, respectively). For AM, a significant decrease in the μ TBS after 1 year of water storage was only observed for the control group ($p=0.002$). For XP, significant decreases in the μ TBS was observed after 1 year for all groups ($p=0.001$); however this decrease was much more pronounced for the control group (reduction of 45%) compared with the CHX-containing adhesives (reduction of 16 to 23%).

Nanoleakage (NL)

The means and standard deviations of NL are shown in Table 5. The cross-product interaction was statistically significant for both adhesives ($p = 0.03$ and $p = 0.0001$ for AM and XP, respectively). In all conditions, NL was observed. For AM, significant differences between the IM and 1Y were detected only for the control group. The other CHX-containing adhesives showed similar percentage of NL in the IM and 1Y periods. For XP, significant differences between IM and 1Y groups were seen for all formulations; however

the highest value of NL was found in the control group compared with the CHX-containing adhesives.

In the IM period, NL was nearly restricted to the hybrid layer; however in the 1Y groups, silver nitrate deposits were detected inside the hybrid layer as well as inside the adhesive layer, mainly for the control groups (Figure 1 and 2).

Ultimate tensile strength (UTS)

For both adhesives, no significant difference was detected in the UTS among formulations ($p = 0.034$ and $p = 0.64$, for AM and XP, respectively). The addition of different CHX concentration did not influence the UTS of the adhesives tested (Table 6).

DISCUSSION

The results of this study showed that the addition of different concentrations of CHX diacetate did not reduce the UTS of the adhesive, which led us to not reject the first null hypothesis. Although several studies have shown that the incorporation of CHX affects the mechanical properties of polymers²²⁻²⁵ and bonding resins^{26,27}, this occurrence seems to be dependent on the CHX concentration²⁸.

In a previous study it was demonstrated that the addition of 1 to 5% of CHX in an adhesive resulted in significant increase in the polymer solubility²⁶, decrease in the elastic modulus and slight reduction of the degree of conversion of experimental hydrophilic adhesives²⁷. Contrary to these findings, the present study did not observe reductions in the UTS, probably due to the fact that much lower CHX concentrations were added to the bonding resins. It is likely that low CHX concentrations do not interfere with the well-balanced monomer/solvent blends, as do not act as a plasticizer within the polymer network. Besides that, CHX was shown to have a good compatibility with chemicals when added to methacrylate polymer²⁹ and adhesive systems^{14,16}. This also explains why the μ TBS and NL of the CHX-containing adhesives in the IM period was similar to the control group, as demonstrated by Zhou et al.¹⁴ after adding different CHX concentrations to a simplified self-etch adhesive.

However, the most promising finding of the present study is that the addition of CHX diacetate, in concentrations lower than 0.2%, produced adhesive solutions capable of preventing (for AM), or at least minimizing (for XP), the degradation of the adhesive

interfaces after 1 year of water storage when compared to the CHX-free adhesives used in the control groups.

The bonded interfaces produced with the control adhesives showed μ TBS reductions of approximately 34% and 44% and NL increases of 45% and 83% (AM and XP, respectively) after 1-year of water storage. These findings are explained by the collagenolytic and gelatinolytic activities of partially demineralized dentin after application of ER adhesives³⁰ due to the activation of MMPs³⁰⁻³² and the complementary role of cysteine cathepsins in collagen degradation^{6,33}. This is responsible for the auto-degradation of partially infiltrated collagen fibrils⁵ and reductions of the resin-dentin bonds over time^{10-13,20,21}.

The direct application of CHX has been shown to inhibit the activity of MMPs³⁴ and cysteine cathepsins³⁵. CHX binds to phosphate groups or to negative carboxyl groups in mineralized dentin crystallites or collagen matrix, respectively³⁶, and due to its substantivity, can remain bonded in demineralized and mineralized dentin substrates³⁷ regardless of the CHX concentration or incubation time³⁶. This is responsible for the stable resin-dentin bond after application of CHX as a primer or added to the phosphoric acid after short to medium-term storage^{10-12,20,21}.

The present study demonstrated that the addition of CHX to the adhesives was also capable to prevent or minimize the degradation of the resin-dentin bonds over a 1 year period. Earlier studies that added CHX in self-etch primers and investigated the durability of the resin-dentin bonds have shown also good results^{14,15,17}. As positive

correlations were observed between water sorption and the cumulative CHX release from simplified hydrophilic adhesives, it is likely that CHX release may be related to water-induced swelling²⁶.

An additional advantage of the incorporation of CHX into adhesives is that the entrapment of CHX within the polymer matrix may produce a CHX reservoir, which may be slowly leached out from the polymer to the surroundings. A controlled release of CHX around collagen fibrils could extend even more the life expectancy of resin-dentin adhesive restorations by slightly transferring CHX to adjacent collagen^{26,27}.

This would be especially important after longer periods of evaluation (i.e. after 18-24 months), since it was already demonstrated that slight and progressive signal of hybrid layer degradation can be seen even in CHX-treated dentin surfaces^{13,38,39}. The application of CHX as a primer or in incorporated in a rinsed phosphoric acid does not produce a CHX reservoir, which may explain this latter but progressive hybrid layer degradation.

In spite of the advantages of CHX incorporation into adhesive formulations, this should be done with care and after careful analysis of chemical compatibility between the formulation and CHX. To produce a functional adhesive, CHX cannot react with any of the components of the adhesive formulation, as this would reduce the bonding ability of the material and reduce the MMP inhibition potential of CHX. This may well explain why De Munck et al.¹⁷ reported that the addition of 0.05% of CHX in a 2-step ER adhesive system (Scotchbond XT 1, 3MESPE) was not enough to preserve the long-term μ TBS. In the preliminary stages of the present study, we attempted to add different concentrations of

CHX diacetate to Scotchbond XT 1 and this resulted in significantly lower immediate μ TBS values when compared to the CHX-free adhesive. When this adhesive was mixed with CHX diacetate it was showed signs of phase-separation with the presence of several resin droplets (not showed data). We hypothesized that this could be the result of a chemical reaction between CHX and some of the components of the adhesive composition.

Although no attempt was done to compare the adhesive systems, the CHX-formulations produced with AM resulted in materials capable to prevent resin-dentin bonds degradation while the ones produced with XP only minimized the reduction of μ TBS after 1 year of water storage. The knowledge that degradation of the resin-dentin bonds is the result of a cascade of events in vivo that begins with swelling and extraction of the resins that had infiltrated the demineralized matrix followed by enzymatic attack of the exposed collagen fibrils⁴⁰ may allow us to understand such differences among materials, as the production of a well polymerized material may retard the degradation of the polymer. XP contains HEMA and PENTA which are recognized as being highly hydrophilic⁴¹. These monomers are not presented in the AM formulation (Table 1). HEMA-containing adhesives were shown to have higher water uptake than HEMA-free adhesives^{4,42} and therefore they are more prone to suffer the plasticizing effects of water earlier than more hydrophobic formulations^{4,42}.

This study provided body of evidence that the incorporation of CHX diacetate in concentrations ranging from 0.01 to 0.2% into two simplified ER adhesives produced functional adhesives capable to prevent or minimize the degradation of the resin-dentin

bonds after over the course of 1 year of water storage. This inclusion however should be done in adhesive formulations compatible with CHX diacetate.

REFERENCES

1. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent Mater* 2005;21:864-881.
2. Heintze SD, Ruffieux C, Rousson V. Clinical performance of cervical restorations-a meta-analysis. *Dent Mater* 2010;26:993-1000.
3. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, Wang Y, Bohaty BS, Singh V, Sene F, Eslick J, Camarda K, Katz JL. Adhesive/Dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng* 2010;38:1989-2003.
4. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater* 2006;22:973-80.
5. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83:216-21.
6. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Salo T, Tjäderhane L. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod* 2010;36:475-81.
7. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008;24:90-101.
8. 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;90:953-68.
9. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater* 2012 Aug 16.
10. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005 Aug;84:741-746.
11. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86:529-533.

12. Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent* 2009;34:481-490.
13. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent* 2011;39:40-47.
14. Zhou J, Tan J, Chen L, Li D, Tan Y. The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. *J Dent* 2009;37:807-812.
15. Zhou J, Tan J, Yang X, Xu X, Li D, Chen L. MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. *J Adhes Dent* 2011;13:111-115.
16. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res* 2009;88:1101-1106.
17. De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci* 2010;118:494-501.
18. Almahdy A, Koller G, Sauro S, Bartsch JW, Sherriff M, Watson TF, Banerjee A. Effects of MMP inhibitors incorporated within dental adhesives. *J Dent Res* 2012;91:605-611.
19. Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusevich V, Walker MP, Wang Y. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J Dent* 2010;38:908-915.
20. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, Cadenaro M, Foulger S, Mazzoti G, Tay FR, Di Lenarda R, Pashley D. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent* 2009;11:191-8.
21. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci* 2009;117:587-596.
22. Botelho MG. Compressive strength of glass ionomer cements with dental antibacterial agents. *SADJ* 2004;59:51-53.
23. Anusavice KJ, Zhang NZ, Shen C. Controlled release of chlorhexidine from UDMA-TEGDMA resin. *J Dent Res* 2006;85:950-954.
24. Wilson SJ, Wilson HJ. The release of chlorhexidine from modified dental acrylic resin. *J Oral Rehabil* 1993;20:311-319.

25. Riggs PD, Braden M, Patel M. Chlorhexidine release from room temperature polymerising methacrylate systems. *Biomaterials* 2000;21:345-351.
26. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater* 2008;24:1391-1399.
27. Cadenaro M, Pashley DH, Marchesi G, Carrilho M, Antonioli F, Mazzoni A, Tay FR, Di Lenarda R, Breschi L. Influence of chlorhexidine on the degree of conversion and E-modulus of experimental adhesive blends. *Dent Mater* 2009;25:1269-1274.
28. Pallan S, Furtado Araujo MV, Cilli R, Prakki A. Mechanical properties and characteristics of developmental copolymers incorporating catechin or chlorhexidine. *Dent Mater* 2012;28:687-694.
29. Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM. Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials* 2005;26:7145-7153.
30. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006;27:4470-4476.
31. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006 Apr;114:160-166.
32. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res* 2012;91:467-472.
33. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldini S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Nader HB, Salo T, Tjäderhane L, Tersariol IL. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res* 2011;90:506-511.
34. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:437-439.
35. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, Pashley DH, Tjäderhane L, Tersariol IL, Nascimento FD, Carrilho MR. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res* 2012;91:420-425.

36. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, Tjäderhane L, Tay FR, Agee K, Pashley DH. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater* 2010;26:779-785.
37. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, Carvalho RM, Tjäderhane L, Looney S, Wimmer C, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater* 2010;26:771-778.
38. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo Ede S, Pashley DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater* 2010;26:320-325.
39. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res* 2010;89:1499-1504.
40. Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *J Dent Res* 2006;85:11-14.
41. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007;28:3757-3785.
42. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, Rueggeberg FA, Foulger S, Saito T, Nishitani Y, Yoshiyama M, Tay FR, Pashley DH. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials* 2005;26:6449-6459.

Table 1 – Adhesive systems, batch number, composition and application mode.

Adhesive systems (manufacturer) batch number	Composition	Mode of application
XP Bond (Dentsply) 0804002271	TCB-resin, Butyl alcohol, PENTA, PPD, UDMA, TEGDMA, HEMA, modified carboxylic acid and dimethacrylate	6. Apply phosphoric acid to dentin for 15 s; 7. Rinse for 15 s. Dry with absorbent paper. Keep dentin wet. 8. Apply the adhesive for 20 s undisturbed. 9. Gently air for 5 s to evaporate the solvent. 10. Light cure for 20 s.
Ambar (FGM) 200910	Methacrylate monomers (UDMA and MDP), photoinitiators, co-initiators, stabilizers, inert silica nanoparticles and ethanol	6. Apply phosphoric acid to dentin for 15 s; 7. Rinse for 15 s. Dry with absorbent paper. Keep dentin wet. 8. Apply two coats vigorously by rubbing the adhesive for 20 s (10 s each) 9. Gently air for 10 s to evaporate the solvent. 10. Light cure for 10 s.

TCB-resin: butan-1,2,3,4-tetracarboxylic acid di-2-hydroxyethylmethacrylate ester; PENTA: dipentaerythritol pentaacrylate monophosphate; PPD: fenilpropanodiona; UDMA: urethane dimethacrylate or 1,6-di(methacryloyloxyethylcarbamoyle)-3,3,5-trimethylhexaan; TEGDMA: triethyleneglycol dimethacrylate, HEMA: 2-hydroxyethyl methacrylate; 10-MDP: 10-methacryloyloxydecyl dihydrogenphosphate.

Table 2 – Number (%) of specimens according to fracture mode for the experimental formulations produced with Ambar.

Groups	IM				1Y			
	A	CR	CD	M	A	CR	CD	M
Control	32 (76)	3 (7)	5 (12)	2 (5)	18 (55)	10 (30)	3 (9)	2 (6)
AM 0.01%	35 (73)	4 (8)	6 (13)	3 (6)	22 (72)	4 (13)	2 (6)	3 (9)
AM 0.05%	34 (71)	5 (10)	4 (9)	5 (10)	23 (70)	3 (9)	5 (15)	2 (6)
AM 0.1%	36 (78)	3 (7)	6 (13)	1 (2)	24 (76)	3 (9)	4 (12)	1 (3)
AM 0.2%	39 (72)	5 (9)	7 (13)	3 (6)	19 (66)	6 (20)	4 (14)	0 (0)

A – adhesive fracture mode; CR – resin cohesive fracture mode; CD – dentin cohesive fracture mode and M - mixed

Table 3 – Number (%) of specimens according to fracture mode for the experimental formulations produced with XP Bond.

Groups	IM				1Y			
	A	CR	CD	M	A	CR	CD	M
Control	30 (79)	4 (11)	3 (7)	1 (3)	25 (79)	2 (6)	3 (9)	2 (6)
XP 0.01%	28 (68)	6 (15)	4 (10)	3 (7)	19 (64)	5 (17)	2 (6)	4 (13)
XP 0.05%	32 (76)	4 (10)	4 (10)	2 (4)	22 (65)	1 (3)	5 (14)	6 (18)
XP 0.1%	28 (65)	8 (19)	5 (11)	2 (5)	18 (62)	4 (14)	5 (13)	2 (7)
XP 0.2%	29 (58)	8 (16)	5 (10)	8 (16)	19 (63)	3 (10)	5 (17)	3 (10)

(*) A – adhesive fracture mode; CR – resin cohesive fracture mode; CD – dentin cohesive fracture mode and M - mixed

Table 4 – Microtensile bond strength means and the respective standard deviations (MPa) obtained in each experimental condition (*).

CHX concentration	Ambar		XP Bond	
	IM	1Y	IM	1Y
Control	54.5 ± 3.9 A	34.8 ± 4.1 B	64.5 ± 2.7 a	35.9 ± 2.8 e
0.01%	56.2 ± 4.3 A	50.8 ± 2.5 A	61.9 ± 5.8 a	47.4 ± 3.2 d
0.05%	51.2 ± 4.1 A	49.6 ± 4.2 A	56.7 ± 3.1 a,b	45.2 ± 5.0 d
0.1%	55.3 ± 3.2 A	53.4 ± 4.5 A	66.9 ± 4.2 a	54.2 ± 4.3 c,d
0.2%	54.1 ± 3.8 A	52.9 ± 7.6 A	67.3 ± 2.6 a	56.5 ± 4.3 c

(*) Comparisons are valid only within adhesives. For each adhesive, means with the same capital or lowercase letters are not significantly different (Tukey's test, $p > 0.05$).

Table 5 – Nanoleakage percentage and the respective standard deviations (%) obtained in each experimental condition (*).

CHX concentration	Ambar		XP Bond	
	IM	1Y	IM	1Y
Control	14.2 ± 3.2 A	20.6 ± 4.3 B	23.2 ± 3.5 a	42.5 ± 3.9 d
0.01%	11.2 ± 3.6 A	16.7 ± 5.1 A,B	16.4 ± 4.2 a	37.1 ± 4.2 c,d
0.05%	11.1 ± 3.7 A	16.1 ± 6.3 A,B	17.4 ± 5.1 a	27.7 ± 5.9 b
0.1%	10.2 ± 4.5 A	16.4 ± 2.8 A,B	16.7 ± 4.7 a	29.3 ± 3.6 b
0.2%	9.8 ± 4.6 A	14.3 ± 2.7 A,B	15.6 ± 6.4 a	30.4 ± 3.8 b

(*) Comparisons are valid only within adhesives. For each adhesive, means with the same capital or lowercase letters are not significantly different (Tukey's test, $p > 0.05$).

Table 6 – Means of the ultimate tensile strength and respective standard deviations (MPa) obtained in each experimental condition (*).

Conditions	Ambar	XP-Bond
Control	9.5 ± 2.2 A	7.2 ± 3.6 a
0.01%	9.7 ± 4.2 A	7.7 ± 4.9 a
0.05%	9.7 ± 3.8 A	7.6 ± 3.8 a
0.1%	9.9 ± 5.1 A	7.5 ± 3.9 a
0.2%	9.8 ± 4.3 A	7.4 ± 4.3 a

(*) Comparisons are valid only within adhesives. For each adhesive, means with the same capital or lowercase letters are not significantly different (Tukey's test, $p > 0.05$).

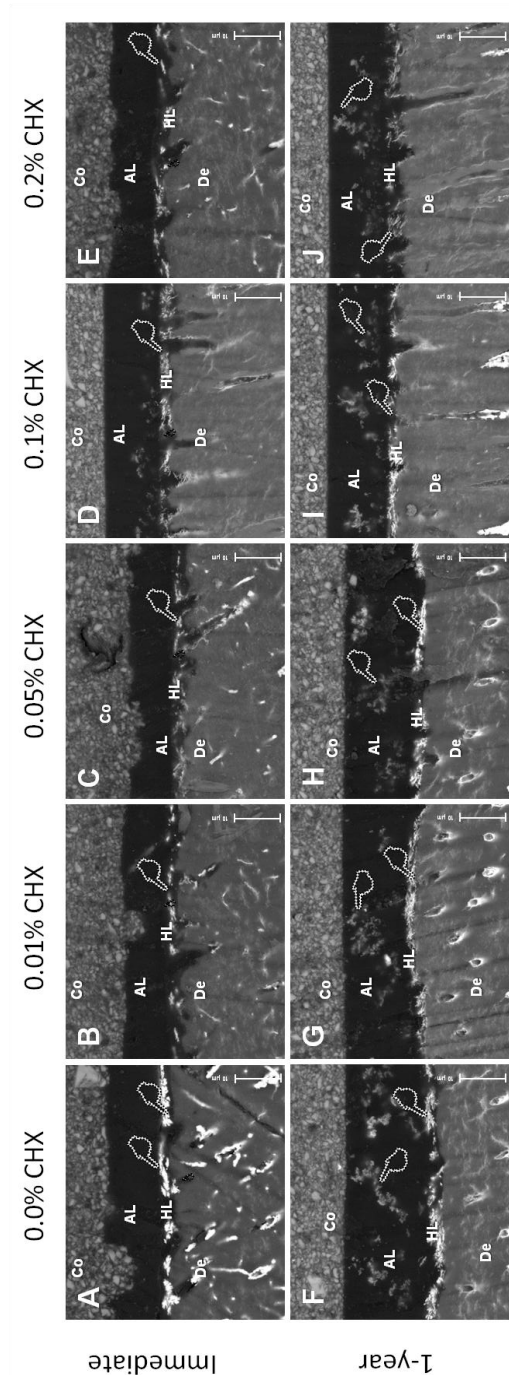


Figure 1 - Representative back-scattering SEM images of the resin–dentin interfaces bonded with Ambar in the immediate time (A–E) or after 1 years of water storage (F–J) according to the different experimental conditions. In the immediate time, only few areas of silver nitrate uptake within HL (A–E) were observed (white stains indicated by white pointer). After 1 year, an increase in the silver nitrate uptake was observed, mainly in the control group. In CHX-treated groups (G–J) showed lower silver nitrate deposition than the control group (F) (Co = composite; AL = adhesive layer; HL = hybrid layer and De = dentin).

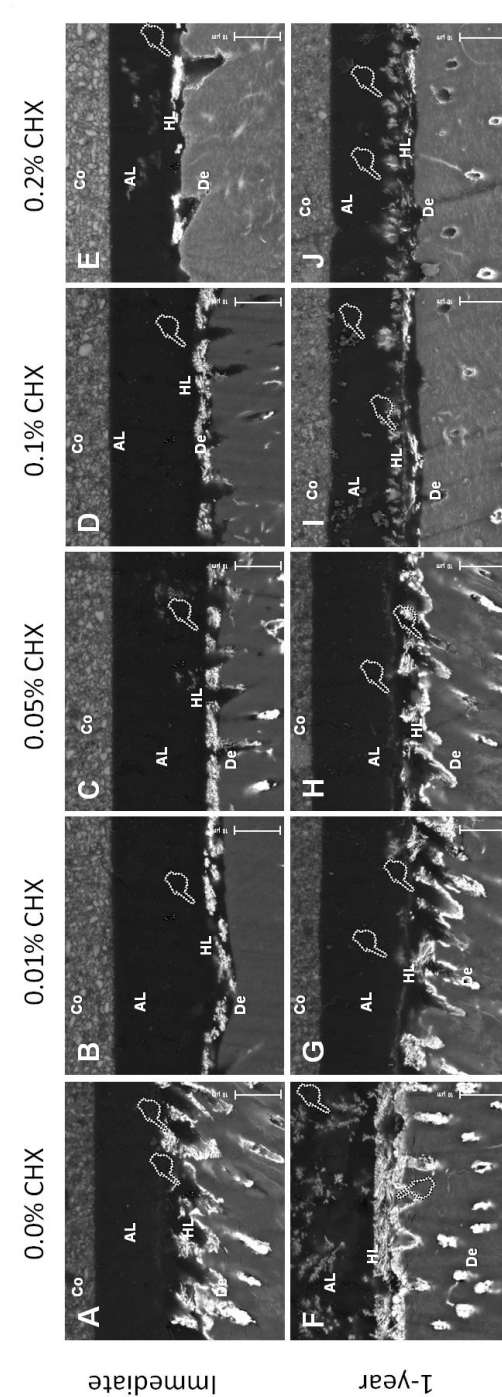


Figure 2 - Representative back-scattering SEM images of the resin–dentin interfaces bonded with XP-Bond in the immediate time (A–E) or after 1 year of water storage (F–J) according to the different experimental conditions. In the immediate time, only few areas of silver nitrate uptake were observed within the hybrid layer (A–E). After 1 year, the amount of silver penetration within the adhesive and hybrid layer was higher in all groups, although less pronounced in the CHX-treated groups (white stains indicated by white pointer) (Co = composite; AL = adhesive layer; HL = hybrid layer and De = dentin).