

# EFEITO DA CLOREXIDINA E SATURAÇÃO DA DENTINA POR ETANOL NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO ADESIVA

## EFFECT OF CHLOREXIDINE AND SATURATION OF DENTINE BY ETHANOL IN ADHESIVE BOND STRENGTH

Luanna Marinho Sereno Nery<sup>1</sup>, Mauro Henrique Saldanha dos Santos Júnior<sup>2</sup>, Talita Leitão Martins<sup>2</sup>, Joyce Figueira de Araújo Gatti<sup>1</sup>, Darlon Martins Lima<sup>3</sup>

### Resumo

**Introdução:** Especula-se que a degradação que ocorre na interface adesiva dentina/resina composta seja resultante da degradação hidrolítica de seus componentes resinosos, e degradação do substrato dentinário desmineralizado associada a deficiente penetração do material adesivo e ação de metaloproteinases. **Objetivo:** Avaliar a influência da associação da aplicação prévia da clorexidina à técnica da saturação da dentina por etanol na resistência de união adesiva, por meio da análise do teste de microtração. **Métodos:** Foram avaliados 32 terceiros molares humanos, recém-extraídos, randomicamente divididos em quatro grupos experimentais (n=8): de acordo com a técnica adesiva utilizada: Grupo 1 – técnica convencional de três passos (TCTP), Grupo 2 – clorexidina + TCTP, Grupo 3 – técnica da adesão úmida por etanol (TAUE), Grupo 4 – clorexidina + técnica da adesão úmida por etanol. Após o procedimento adesivo, os substratos dentinários foram restaurados com incrementos de 2mm de resina composta nanoparticulada e fotopolimerizados por 40 segundos. Os corpos-de-prova foram seccionados em palitos com área de seção retangular de aproximadamente 0,9 mm<sup>2</sup> e após 24h foram submetidos ao teste de microtração. Os dados foram analisados por meio do teste ANOVA-1 fator e nível de significância de 5,0%. **Resultados:** As médias e desvios-padrão após 24h foram: G1 – 43,24 (±11,95), G2 – 42,17 (±9,20), G3 – 33,54 (±9,90), G4 – 44,53 (±8,01). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as diferentes técnicas adesivas após 24h de armazenamento (p > 0,05). **Conclusão:** A aplicação prévia da clorexidina em conjunto com a saturação da dentina por etanol não alterou a resistência de união imediata do sistema adesivo utilizado.

**Palavras-chave:** Adesão úmida por etanol. Clorexidina. Adesivos dentinários. Resistência de União.

### Abstract

**Introduction:** It is speculated that the degradation occurring at the dentin / composite adhesive interface is due to the hydrolytic degradation of its resinous components and degradation of the demineralized dentin substrate associated with poor penetration of the adhesive material and the action of metalloproteinases. **Objective:** To evaluate the influence of adjunctive application of chlorhexidine and Ethanol wet bonding on the bond strength, by the microtensile test analysis. **Methods:** 32 humans third molars freshly extracted, collected and were randomly divided into four experimental groups (n = 8): According to the adhesive technique used: Group 1 - conventional technique 3-steps (SBMP), Group 2 - chlorhexidine + SBMP, Group 3 - ethanol-wet bonding (EWB), Group 4 - chlorhexidine (CHX) + ethanol-wet bonding (EWB). After application of the adhesive technique, the dentin surface was restored with 2mm increments composite nanoparticle photopolymerized for 40 seconds. Specimens were cut into sticks with rectangular area of approximately 0.9 mm<sup>2</sup> and after storage of 24 were tested for microtensile bond strength Data were analyzed using ANOVA-1 factor and a significance level of 5.0% test. **Results:** The mean and standard deviations after 24 hours were: G1 - 43.24 (11.95), G2 - 42.17 (9.20), G3 - 33.54 (9.90), G4 - 44.53 (8.01). No significant differences were found between the different adhesive techniques after 24 hours of storage (p > 0.05). **Conclusion:** Thus, one can conclude that the prior application of chlorhexidine in association with the ethanol-wet bonding did not change the immediate bond strength of the adhesive system used.

**Keywords:** Ethanol wet-bonded. Chlorhexidine. Dentin adhesive. Bond strength.

### Introdução

Com o avanço da odontologia adesiva, houve uma forte tendência em simplificar as técnicas adesivas, reduzindo assim o tempo de aplicação e sua complexidade<sup>1</sup>. No entanto, essa simplificação levou à incorporação de uma grande concentração de monômeros resinosos hidrofílicos tanto nos adesivos convencionais quanto nos autocondicionantes, proporcionando a formação de membranas semipermeáveis e matrizes resinosas instáveis na presença de água<sup>2</sup>.

Especula-se que a degradação que ocorre na interface adesiva dentina/resina composta seja o resultado de um efeito combinado da degradação de seus componentes resinosos, pela sorção de água e hidrólise, e da degradação do substrato dentinário

desmineralizado exposto pelo condicionamento ácido e não protegido pela resina, que também sofre hidrólise das suas fibrilas colágenas<sup>3,4</sup>.

A degradação das fibrilas de colágeno pode ser acelerada pela reativação de enzimas endógenas conhecidas como metaloproteinases (MMPs), presentes em estado inativo na dentina<sup>4-6</sup>. Situações como a liberação de ácidos no desenvolvimento da cárie e condicionamento ácido prévio à aplicação do adesivo podem reativá-las, uma vez que, estas enzimas são dependentes do pH<sup>7</sup>.

Estudos in vitro mostraram que a utilização de clorexidina, após o condicionamento ácido, não comprometeu a adesão dos sistemas adesivos convencionais nem autocondicionantes<sup>5,6,8</sup>. Foi demonstrado que a aplicação de clorexidina, conhecida por ser um inibi-

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal do Maranhão - UFMA.

<sup>2</sup> Curso de Odontologia. Universidade Federal do Maranhão - UFMA.

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia - UFMA.  
Contato: Darlon Martins Lima. E-mail: darlonmartins@yahoo.com.br

dor de MMP de largo espectro<sup>9</sup>, aumentou significativamente a integridade da camada híbrida em um ensaio clínico de seis meses<sup>10</sup>.

Outro problema presente na interface adesiva é a penetração incompleta dos sistemas adesivos e sua susceptibilidade à degradação hidrolítica ao longo do tempo, devido ao caráter hidrofílico da camada híbrida formada. Para contornar tal situação, tem sido pesquisada uma nova técnica adesiva, onde agentes adesivos mais hidrófobos são aplicados em uma dentina saturada por etanol, os quais são menos susceptíveis à sorção de fluídos intra e extra orais. Essa técnica conhecida como técnica da adesão úmida por etanol (TAUE) tem mostrado resultados laboratoriais favoráveis<sup>11,12</sup>. Na TAUE, a dentina é saturada por meio da aplicação progressiva de concentrações crescentes de etanol, seguida pela aplicação de um primer hidrofóbico e posteriormente de um adesivo hidrofóbico, formando uma camada híbrida menos hidrofílica e mais resistente à degradação hidrolítica e à ação das MMP. A saturação da dentina por meio da substituição da água por etanol mantém a matriz colágena expandida e transforma o substrato mais compatível à penetração de monômeros hidrófobos, seja aumentando a resistência e efetividade da adesão<sup>13,14</sup>.

Embora as duas técnicas tenham demonstrado benefícios para a interface adesiva, não se conhece se a associação delas teria um efeito positivo adicional. Com base nessas informações e com o intuito de preservar a interface adesiva, o presente estudo se propõe a avaliar *in vitro* o efeito do uso do digluconato de clorexidina associado à técnica da adesão úmida por etanol na resistência de união compósito-dentina, por meio do teste de microtração. Assim a hipótese nula do presente estudo foi que a utilização da clorexidina, da técnica de adesão úmida por etanol e a associação de ambas não interferem na resistência de união imediata do sistema adesivo convencional de três passos.

## Método

### *Delineamento Experimental*

O tratamento da superfície dentinária foi analisado em quatro níveis (Controle, Clorexidina, TAUE, Clorexidina + TAUE). As unidades experimentais foram constituídas por 32 terceiros molares humanos recém-extraídos, divididos de forma randomizada entre os grupos, a receberem os diferentes tratamentos adesivos (n=8). O tamanho amostral foi obtido com base nos resultados da pesquisa de Simões *et al.*,<sup>15</sup> considerando um poder de 80% e nível de significância de 0,05%. A variável de resposta, resistência de união, em MPa (Mega Pascal) foi avaliada quantitativamente, por meio do ensaio de microtração. Realizou-se a análise estatística com o teste ANOVA 1 fator (técnica adesiva), Student Newman Keuls e teste t de Student.

### *Seleção, armazenamento e desgaste dos dentes.*

Trinta e dois terceiros molares humanos, recém-extraídos, foram coletados e armazenados em solução de timol a 0,1% até o momento de sua utilização, limpos com curetas periodontais (*Millenium*, São Caetano

do Sul, SP, Brasil) e polidos em baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com taça de borraça (Microdont, São Paulo, SP, Brasil) embebida em mistura de pedra pomes (SSWHITE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água.

Os dentes foram inicialmente cortados no seu terço oclusal, com um disco diamantado acoplado a máquina de corte (ISOMET 1000 – Buehler, Illinois, EUA); as ilhas de esmalte da superfície oclusal foram removidas com lixas de carbetto de silício de granulação 18016 (3M, Sumaré, SP, Brasil) desgastando-as sob irrigação constante de água.

O esmalte das bordas periféricas também foi removido, com pontas diamantadas 2135 (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) em alta rotação, com finalidade de expor todo tecido dentinário para a confecção dos corpos-de-prova; dois terços da porção radicular apical também foram removidos.

Ao fim dos desgastes fez-se a padronização da camada de smear layer, lixando a superfície dentinária com lixas de carbetto de silício com granulação 18016 (3M, Sumaré, SP, Brasil) por 60s. A ausência de esmalte pode ser verificada com auxílio de lupa estereoscópica (Kozo Optical and Electronical instrumental, Nanjing, Jiangsu, China).

### *Procedimentos adesivos*

As amostras foram randomicamente divididas em quatro grupos experimentais (n=8), de maneira aleatória por sorteio dos grupos para cada dente a ser restaurado, os quais receberam os procedimentos adesivos conforme o grupo ao qual pertenciam, de acordo com a descrição abaixo:

G1 – *Scotchbond Multi-Purpose Plus (SBMP)* - Aplicação de ácido fosfórico 37,0% na dentina por 15 segundos. Lavagem por 15 segundos e secagem com papel absorvente. Aplicação do primer com o uso de microbrush e secagem com jato de ar por 5 segundos. Aplicação do adesivo com o uso de *microbrush* e fotopolimerização (*DEEMILED Curing light*; Kerr; C.A. EUA) em uma intensidade de luz de 800mW/cm<sup>2</sup> por 10 segundos. O fotopolimerizador foi aferido em radiômetro (*Demetron LC Curing Light*, Kerr, Orange, CA, EUA) para calibração durante a execução dos procedimentos laboratoriais.

G2 – *Scotchbond Multi-Purpose Plus + Clorexidina (SBMP/CHX)* – ácido fosfórico 37,0% na dentina por 15 segundos. Lavagem por 15 segundos e secagem com papel absorvente. Aplicação da clorexidina por 60 segundos e secagem com papel absorvente. Aplicação do *primer* e adesivo semelhante ao G1.

G3 – Técnica da adesão úmida por etanol (TAUE) – Aplicação de ácido fosfórico a 37,0% na dentina por 15 segundos. Lavagem por 15 segundos e secagem com papel absorvente. Aplicação com *microbrush* de 50µL de etanol 50,0% na dentina 10 segundos com agitação e 10 segundos em repouso. Aplicação com *microbrush* de 50µL de etanol 100,0% na dentina 10 segundos com agitação e 10 segundos em repouso. Aplicação do “*primer* hidrófobo” por 20 segundos e

seguido de um jato de ar suave por 5 segundos. Aplicação do adesivo, e fotopolimerização por 10 segundos.

O "primer hidrófobo" experimental foi confeccionado diluindo 2 ml do adesivo puro (frasco 2 do SBMP) em um volume em peso de etanol absoluto correspondente a 10% do peso em gramas do adesivo. Após homogeneização das substâncias, a mistura foi armazenada sob refrigeração e acondicionada em frasco para proteção do contato direto com a luz até o momento de sua utilização, juntamente com as soluções de etanol 50,0% e 100,0%. Cada mistura foi utilizada dentro de um período máximo de 15 dias com a finalidade de evitar alterações deste primer que era armazenado em *ependorf*.

G4 - Clorexidina + Técnica da adesão úmida por etanol (CHX/TAUE) - Aplicação de ácido fosfórico a 37% na dentina por 15 segundos. Lavagem por 15 segundos e secagem com papel absorvente. Aplicação da clorexidina por 60 segundos e secagem com papel absorvente. Saturação da dentina e aplicação do adesivo semelhante ao G3.

#### Procedimentos restauradores

Após o procedimento adesivo foram confeccionadas "coroas" com resina composta nanoparticulada Z350XT (3M-ESPE, Sumaré, SP, Brasil) com aproximadamente 6,0 mm de altura, em três incrementos de 2 mm. Cada incremento fotoativado por 40s (DEMI LED Curing light; Kerr, Orange, CA, EUA) em uma intensidade de luz de 800mW/cm<sup>2</sup>. As unidades experimentais foram armazenadas em seguida em água destilada a 37°C, em uma estufa (QUIMIS, São Paulo, SP, Brasil) por 24 horas. Os materiais utilizados, sua composição e fabricantes estão especificados no Quadro 1.

Material	Fabricante	Composição	Lote
Adper Scotchbond Multi-Purpose Plus	3M ESPE	Primer: HEMA, copolímero do ácido polialcenóico, água. Adesivo: Bis-GMA, HEMA, copolímero do ácido polialcenóico, canforoquinona.	N470622 / N465871
Clorexidina	FGM	2% de gluconato clorexidina	120913
Primer hidrófobo		Bis-GMA, HEMA, copolímero do ácido polialcenóico, canforoquinona + 10% de seu volume em etanol 100%.	-
Etanol absoluto	Chemco Ltda.	99,8% de álcool etílico; 0,20% água.	A00169
Filtek Z350XT	3M ESPE	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, bis-EMA e nanopartículas de sílica e zircônia.	147905

Quadro 1 - Materiais, fabricantes e composição.

#### Obtenção dos espécimes para os testes de microtração

Para a execução do teste, cada unidade experimental foi fixada com cera pegajosa a um dispositivo

levado à máquina de corte (ISOMET 1000 - Buehler, Illinois, EUA) com a interface de união perpendicular ao disco de corte. Realizadas duas sequências de cortes longitudinais e perpendiculares entre si para obtenção de corpos-de-prova (CP) com formato de palitos e com área de seção retangular de aproximadamente 0,9 (±1,0) mm<sup>2</sup>. O número de palitos perdidos prematuramente durante o preparo dos CP foi registrado.

Os CP de cada dente foram armazenados em solução de água deionizada a 37°, submetendo-os ao teste de microtração 24 horas após sua confecção. Cada CP foi fixado com cola de cianoacrilato gel em uma garra. Esta garra foi acoplada a uma máquina de ensaios universal (*Instron 3342, Cantom, EUA*), de maneira que as tensões de tração ocorressem perpendicularmente à interface da união. Os ensaios de resistência de união foram realizados a uma velocidade de 1.0 mm/min., até a ruptura do CP e os resultados expressos em MPa.

Os dados foram analisados por meio do teste ANOVA 1 fator, adotando-se o nível de significância de 5,0% e poder de 80%. A normalidade dos grupos foi avaliada por meio do teste *Shapiro-wilk*, utilizando-se o programa Bioestat® v5. Os valores obtidos nos testes de resistência de união foram tabulados e submetidos à análise estatística ANOVA e *Tukey*, adotando-se o nível de significância de 5,0% para contraste de média.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/ Universidade Federal do Maranhão (CEP/UFMA), com o nº 1.073.571.

#### Resultados

A média de valores de resistência de união variaram de 33,54 MPa a 44,53 MPa. A maior média foi observada no grupo onde houve associação da aplicação da clorexidina com a técnica da adesão úmida por etanol. No entanto, após análise estatística por meio da ANOVA 1 fator, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 - Média da resistência de união (Mpa), desvio-padrão, e área média dos palitos das técnicas adesivas avaliadas por meio do teste de microtração.

Grupos	Média em Mpa	Desvio-padrão	Média da área dos palitos	p-valor
G1	43,25	11,95	0,85	0,1307
G2	42,17	09,20	0,92	
G3	33,54	09,91	0,89	
G4	44,53	08,01	0,89	

ANOVA 1 fator;  $p > 0,05$

Para a análise, somente foram consideradas as falhas adesivas, ocorridas na interface dentina-resina, sendo este tipo de falha o mais prevalente (Tabela 2).

Tabela 2 - Tipos de falhas observadas nos grupos avaliados em valores absolutos.

Grupos	Tipos de Falhas	
	Adesiva	Coesiva
G1	41	7
G2	52	2
G3	50	4
G4	49	9

## Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo apontam que a utilização da clorexidina e da técnica de adesão úmida por etanol em associação ou isoladas, mantiveram os mesmos padrões de resistência de união do grupo controle.

A degradação da união resina-dentina tem sido demonstrada em vários estudos *in vitro*<sup>3,17-19</sup> e *in vivo*<sup>5,6,20</sup>. Embora o exato mecanismo de deterioração da interface adesiva ainda não seja totalmente conhecido, sabe-se que seus componentes estão sujeitos aos efeitos deletérios da presença de água circulante na interface (degradação hidrolítica) e da ação de enzimas proteolíticas.

A degradação enzimática é mediada pelas MMP da matriz dentinária. Essas hidrolases atuam nas fibras de colágeno expostas na base da camada híbrida<sup>6,21</sup> devido à discrepância entre a profundidade de desmineralização ácida da dentina e a infiltração monomérica durante os procedimentos adesivos<sup>11</sup>.

A clorexidina apresenta, além de comprovado efeito antimicrobiano, a propriedade de inibir as MMP<sup>4,22</sup>. Quando utilizada a solução aquosa de clorexidina a 2,0% como agente coadjuvante no processo de adesão polimérica ao substrato dentinário, observou-se que ela não interferiu negativamente no desempenho adesivo imediato<sup>4,5,8</sup> dos materiais resinosos, o que é concordante com os achados do presente estudo, uma vez que este, também não demonstrou influência negativa nos valores de resistência de união. Até mesmo maiores valores de resistência de união foram observados para alguns sistemas adesivos quando aplicados sobre a dentina condicionada e impregnada pela clorexidina<sup>23,24</sup>. Entretanto, se por um lado a utilização de clorexidina favorece a estabilidade das fibras de colágeno expostas na união, por outro, o componente resinoso continua vulnerável à degradação hidrolítica, favorecida pelos sistemas adesivos que contêm componentes hidrófilos devido à característica úmida da dentina.

A possibilidade de infiltração da dentina desmineralizada com monômeros mais hidrofóbicos e, portanto, mais resistentes à degradação hidrolítica, tem sido recentemente investigada<sup>25-29</sup>. Idealmente, os sistemas adesivos que possuem monômeros hidrófobos em sua composição são mais estáveis quimicamente e mecanicamente<sup>15</sup>. Contudo, para que tais monômeros, como o BisGMA (bisfenol A glicidil metacrilato), BisEMA (bisfenol-etil-dimetacrilato) e UDMA (uretano dimetacrilato) possam permear os espaços interfibrilares é necessário tornar o meio menos hidrofílico, condição essa que pode ser temporariamente alcançada pela substituição da água, a qual mantém a matriz de colágeno expandida e por consequência as vias para difusão do adesivo, por etanol, técnica denominada "ethanol wet-bonding"<sup>30</sup>.

Inicialmente existem variáveis significantes na aplicação da técnica de saturação úmida por etanol TAUE que refletem diretamente nos resultados dos testes imediatos de microtração. A primeira variável, diz respeito à concentração da solução. Testes realizados com

etanol a 100%, sem aplicações crescentes de concentração<sup>12,15,23,31</sup>, apresentaram valores iguais<sup>31</sup> ou ligeiramente inferiores<sup>5,16</sup> ao grupo controle, com exceção do estudo de Emkabaram *et al.*,<sup>31</sup> que encontrou resultados significativamente mais alto, comparado ao grupo controle. Enquanto isso, testes realizados com aplicação progressiva de etanol, apresentaram valores de resistência de união imediata semelhantes ao grupo controle<sup>16,26</sup>, concordando com os achados desse estudo.

A segunda variável em relação à técnica corresponde ao tempo de saturação da dentina por etanol que varia extensivamente na literatura, havendo casos de testes anteriores com aplicações de 20s, 30s<sup>16,31</sup>, 60s<sup>15,16,23,26</sup> e ainda aliado a séries de aplicações crescentes de concentrações que apresentam ao final da técnica um tempo clínico de 210s<sup>16</sup>. Embora possuam resultados efetivos, não possuem valor clínico, devido à maior demanda de tempo, justificando assim uma técnica mais simplificada de saturação, como a utilizada neste estudo. No modelo utilizado, houve redução do tempo, e manutenção da técnica de saturação crescente de etanol no preparo da dentina, com valores de resistência de união próximos ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Adicionalmente, espera-se que o material hidrófobo, presente no sistema adesivo usado no presente trabalho possa manter a integridade da camada de adesão obtida.

Ainda, examinando o efeito da associação das técnicas de aplicação prévia de clorexidina e saturação da dentina por etanol na resistência de união imediata de um sistema adesivo hidrófobo, os resultados mostraram que a aplicação associada teve um efeito de interação na preservação da resistência de união, comparado a técnica de adesão úmida por etanol isolada, mantendo os valores próximos ao grupo convencional.

Apesar de não se comprovar por meio deste estudo, especula-se que há inibição das metaloproteínas, redução de sorção de água e degradação hidrolítica pela técnica associada em função do tempo, visto que estudos confirmam por meio de seus valores de resistência de união aos testes de microtração com 6 meses<sup>15</sup> e 1 ano<sup>2,23</sup> uma diminuição atenuada, comparado ao grupo de teste pela técnica convencional ou ainda as técnicas isoladas.

De maneira geral, uma vez que tanto a utilização de clorexidina quanto a saturação da dentina desmineralizada com etanol têm demonstrado resultados favoráveis quanto à estabilidade da união resina-dentina ao passar do tempo<sup>15,22,23</sup>, é plausível acreditar que poderia haver um sinergismo com a associação de ambos, bem como um efeito positivo sobre a longevidade e durabilidade das restaurações adesivas pela técnica associada. Além disso, espera-se que o material hidrófobo, presente no sistema adesivo usado no presente trabalho possa manter a integridade da camada de adesão por um longo tempo.

A aplicação prévia da clorexidina, da técnica de saturação da dentina por etanol, e associação das duas, não alterou a resistência de união imediata do sistema adesivo convencional de três passos utilizado.

## Referências

1. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, *et al.* A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*, 2005; 84(2): 118-132.
2. Yiu CKY, King NM, Carrilho MRO, Sauro S, Rueggeberg FA, Prati C, *et al.* Effect of resin hydrophilicity and temperature on water sorption of dental adhesive resins. *Biomaterials*, 2006; 27(9): 1695-703.

3. Carrilho MR de O, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Marins Carvalho R. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater*, 2005; 21(3): 232-241.
4. Pappas M, Burns DR, Moon PC, Coffey JP. Influence of a 3-step tooth disinfection procedure on dentin bond strength. *J Prosthet Dent*, 2005; 93(6): 545-550.
5. Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldini S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res*, 2007; 86(1): 90-94.
6. Guimarães LA, Almeida JCF, Wang L, D'Alpino PHP, Garcia FCP. Effectiveness of immediate bonding of etch-and-rinse adhesives to simplified ethanol-saturated dentin. *Braz Oral Res*, 2012; 26(2): 177-182.
7. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res*, 2006; 85(1): 22-32.
8. Castro FL, de Andrade MF, Duarte Júnior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent*, 2003; 5(2): 129-138.
9. Mortazavi V, Samimi P, Rafizadeh M, Kazemi S. A randomized clinical trial evaluating the success rate of ethanol wet bonding technique and two adhesives. *Dent Res J (Isfahan)*, 2012; 9(5): 588-594.
10. Amaral FLB, Colicci V, Palma-Dibb RG, Corona SAM. Assessment of in vitro methods used to promote adhesive interface degradation: a critical review. *J Esthet Restor Dent*, 2007; 19(6): 340-353.
11. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res*, 2009; 88(2): 146-151.
12. Sadek FT, Castellán CS, Braga RR, Mai S, Tjäderhane L, Pashley DH, et al. One-year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater*, 2010; 26(4): 380-386.
13. Araújo JF, Barros TA de F, Braga EMF, Loretto SC, e Souza P de ARS, e Souza Júnior MHS. One-year evaluation of a simplified ethanol-wet bonding technique: A randomized clinical trial. *Braz Dent J*, 2013; 24(3): 267-273.
14. Cecchin D, de Almeida JFA, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CCR. Influence of chlorhexidine and ethanol on the bond strength and durability of the adhesion of the fiber posts to root dentin using a total etching adhesive system. *J Endod*, 2011; 37(9): 1310-1315.
15. Simões D, Basting R, Amaral F, Turssi C, França F. Influence of chlorhexidine and/or ethanol treatment on bond strength of an etch-and-rinse adhesive to dentin: an in vitro and in situ study. *Oper Dent*, 2014; 39(1): 64-71.
16. Sadek FT, Mazzoni A, Breschi L, Tay FR, Braga RR. Six-month evaluation of adhesives interface created by a hydrophobic adhesive to acid-etched ethanol-wet bonded dentine with simplified dehydration protocols. *J Dent*, 2010; 38(4): 276-283.
17. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent*, 2009; 34(4): 379-383.
18. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent*, 2009; 37(2): 108-114.
19. Soares CJ, Pereira CA, Pereira JC, Santana FR, Prado CJ. Effect of chlorhexidine application on microtensile bond Strength to Dentin. *Oper Dent*, 2008; 33(2): 183-188.
20. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent*, 2007; 32(2): 107-111.
21. Carrilho MRO, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*, 2007; 86(6): 529-533.
22. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2009; 90(1): 373-380.
23. Dalkilic EE, Omurlu H. Two-year clinical evaluation of three adhesive systems in non-carious cervical lesions. *J Appl Oral Sci*, 2012; 20(2): 192-199.
24. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*, 2007; 20(1): 7-20.
25. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di R, Carrilho MRO, et al. Effect of adhesive hydrophilicity and curing-time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid- etched dentin. *Sci York*, 2010; 25(1): 39-47.
26. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*, 2005; 84(8): 741-746.
27. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res Part A*, 2008; 84A(1): 19-29.
28. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater*, 2009; 25(8): 1050-1057.
29. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MRO, Hur YB, Garrett LV, et al. Bonding BisGMA to dentin - a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res*, 2007; 86(11): 1034-1039.
30. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*, 2004; 83(3): 216-221.
31. Ekambaram M, Yiu CKY, Matinlinna JP, King NM, Tay FR. Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bonds to sound and caries-affected dentine. *J Dent*, 2014; 42(6): 709-719.