

INCORPORAÇÃO DE MICROESFERAS CONTENDO CLOREXIDINA EM SISTEMA ADESIVO

INCORPORATION OF CHLOREXIDINE LOADED-MICROSPHERES IN ADHESIVE

Melissa Ballier ¹, Felipe Weidenbach Degrazia ², Luíza Abrahão Frank ³, Melissa Camassola⁴, Fabricio Machado Silva ⁵, Robson Teixeira Araújo ⁶, Bruna Genari ⁷

¹ Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF

² Professor, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

³ Professora, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

⁴ Professora, Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Porto Alegre, RS.

⁵ Professor, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

⁶ Pesquisador, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

⁷ Professora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi desenvolver microesferas contendo Clorexidina (ME-CHX), caracterizá-las e incorporá-las a um adesivo odontológico, além de avaliar suas propriedades biológicas e químicas. **Métodos:** A formulação das ME-CHX foi realizada utilizando o polímero Eudragit® S100 (50 mL) em solução etanólica de clorexidina a 2mg/ml (250 µL), triglicerídeos de cadeia média (825 µL), Span® 60 (0,19g), etanol (27 mL), polissorbato 80 (0,3840 g), água (250 mL) e ácido deoxicólico (0,1501g). A suspensão foi processada por um equipamento de spray dryer em ciclo aberto. As ME-CHX foram mensuradas por difração a laser e a análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram adicionadas ao adesivo Adper™ Scotchbond™ Multiuso (3M ESPE) nas concentrações de 5% e 7,5% em massa e um grupo foi mantido sem partículas, como controle. Foram realizados os testes de grau de conversão (GC) (n=3) e citotoxicidade (CT) (n=3). **Resultados:** O diâmetro médio das partículas foi de 1µm. A análise através de MEV mostrou o aspecto esférico das partículas. Os resultados obtidos para as diferentes concentrações de microesferas nos adesivos foram comparados por ANOVA e Tukey. O GC não apresentou diferença entre os grupos (p=0.51), variando de 53,86±2,87% e 56,89±5,38%. Em CT, os adesivos mantiveram a viabilidade celular acima de 80% após 24h e

48h de contato. **Conclusões:** Microesferas de clorexidina foram produzidas e incorporadas ao adesivo sem efeitos citotóxicos e sem comprometer a polimerização do material.

Palavras-Chave: Microesferas; Clorexidina; Adesão dentinária

Abstract

Objective: The aim of this study was to develop microspheres containing Chlorhexidine (ME-CHX), characterize and incorporate them into a dental adhesive, in addition to evaluating their biological and chemical properties. **Methods:** The formulation of ME-CHX was carried out using Eudragit® S100 as a polymer (50 mL) in 2mg/ml chlorhexidine ethanolic solution (250 µL), medium chain triglycerides (825 µL), Span® 60 (0,19g), ethanol (27 mL), polysorbate 80 (0.3840g), water (250ml) and deoxycholic acid (0.1501g). The suspension was processed by a spray drying equipment in an open cycle. ME-CHX were measured by laser diffraction and morphological analysis by scanning electron microscopy (SEM). They were added to Adper™ Scotchbond™ Multipurpose Adhesive (3M ESPE) at concentrations of 5% and 7.5% by mass and one group was maintained without particles, as a control. Degree of conversion (GC) (n=3) and cytotoxicity (CT) (n=3) tests were performed. **Results:** The average particle diameter was 1µm. A SEM

analysis showed the spherical appearance of the particles. The results obtained for the different concentrations of microspheres in the adhesives were compared by ANOVA and Tukey. The CG showed no difference between the groups ($p=0.51$), ranging from $53.86\pm 2.87\%$ and $56.89\pm 5.38\%$. In CT, the certificates maintained cell viability above 80% after 24h

and 48h of contact. **Conclusions:** Chlorhexidine microspheres were produced and incorporated into the adhesive without cytotoxic effects and without compromising the polymerization of the material.

Keywords: Microspheres; Chlorhexidine; Dentin adhesion

Contato: balliermelissa@gmail.com / brunagenari@ufmg.br

ENVIADO: 10/03/2023
ACEITO: 24/11/2023
REVISADO: 19/12/2023

INTRODUÇÃO

A odontologia restauradora com resina composta é possível dados os conceitos de adesão, pela infiltração resinosa aos prismas de esmalte, túbulos dentinários e fibras colágenas, formando o que se conhece como camada híbrida.^{33,36} O desempenho desse embricamento depende tanto dos agentes do sistema adesivo quanto das características teciduais, em especial da malha colágena.¹⁹ A integridade e estabilidade das fibrilas de colágeno, envoltas pelo material resinoso, são a base estrutural para durabilidade adesiva.²⁷

O maior desafio se deve ao processo de degradação polimérica e ação enzimática às fibras colágenas expostas, podendo comprometer a estabilidade da câmara híbrida.^{23,12} Como resultado, ocorrem falhas clínicas e necessidade de substituição de restaurações.^{12,15,16,17,23,34} Essa ação enzimática às fibras colágenas ocorre em especial devido às metaloproteinases de matriz (MMPs) potencialmente ativadas pelo processo cariioso e ação de condicionadores ácidos.^{30,36} A dentina contém diferentes MMPs, como colagenase MMP-8, gelatinases MMP-2 e -9, estromelina MMP-3 e enamelinase MMP-20.^{12,31} No entanto, as atividades colagenolítica e gelatinolítica podem ser controladas por inibidores de protease.¹⁰

Alguns inibidores de MMPs têm sido investigados na odontologia adesiva, como a clorexidina (CHX), tetraciclina, EDTA e sais de amônio quaternário como o brometo de 12-metacrilóiloxidodecil piridínio (MDPB).³⁶ Entre esses inibidores, o uso de CHX como inibidor

não específico de MMPs têm apresentado resultados promissores na inibição de pelo menos três tipos de MMPs: MMP-2, MMP-8 e MMP-9.^{36,5} Sua capacidade é atribuída à ação quelante e de eliminação dos íons cálcio e zinco, essenciais para o funcionamento enzimático.¹⁹ Há controvérsias quanto ao benefício a longo prazo da aplicação de CHX diretamente à dentina.^{6,26} Ademais, o uso da solução de CHX sobre a dentina condicionada é mais uma etapa do procedimento adesivo,³² seguida pela lavagem do substrato dentinário, que pode afetar negativamente sua concentração efetiva e tornar o substrato indesejavelmente mais úmido.^{36,24} Portanto, a incorporação de CHX no sistema adesivo pode ser uma alternativa para otimizar seu uso, com a eliminação de uma etapa adicional e suas consequências indesejadas.²⁸

Contudo, além da incorporação da CHX nos sistemas adesivos, aliá-la a um sistema polimérico de liberação controlada pode ser capaz de preservar as propriedades adesivas e melhorar seu desempenho.^{36,18,21} Agentes ativos têm sido incorporados em sistemas poliméricos para uso em dentina.^{1,28,18,21} Partículas com diferentes características físico-químicas de dimensões micro ou nanométricas são obtidas de acordo com seu processo de confecção e com as características do agente ativo utilizado.²⁰ Até o presente momento, não há estudos que apresentem sistemas adesivos com a incorporação de partículas poliméricas contendo CHX.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi sintetizar, caracterizar e incorporar microesferas contendo clorexidina (ME-CHX)

a um adesivo e a posterior avaliação do grau de conversão e citotoxicidade do material resultante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação das ME-CHX

A formulação foi realizada com uma fase orgânica composta pelo polímero Eudragit® S100 (50 mL) e solução etanólica de clorexidina a 2mg/ml (250 µL), triglicerídeos de cadeia média (825 µL), Span® 60 (0,19g) e etanol (27 mL), além de uma fase aquosa composta por polissorbato 80 (0,3840 g), água (250 mL) e ácido deoxicólico (0,1501g). A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa sob agitação magnética a 25 °C. O excesso de etanol e água foi eliminado usando um evaporador rotativo (Rotavapor II, Buchi, Flawil, Suíça), um resfriador de recirculação B-740 (Buchi, Flawil, Suíça) e uma bomba de vácuo U-700 (Buchi, Flawil, Suíça).

Para originar partículas secas, utilizou-se manitol (200 mg) como adjuvante de secagem e a suspensão foi processada por um equipamento de spray dryer (B-290, Buchi, Flawil, Suíça) em ciclo aberto. A temperatura de entrada foi de aproximadamente 60 ± 4 °C e a de saída de 40 ± 4 °C, aspiração de 100%, razão de bomba (pump) a 20% e pressão de ar comprimido a 50 kgf/cm².

Caracterização das microesferas

O tamanho das ME-CHX em solução foi mensurado pela difração a laser (Mastersizer 2000, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). A análise morfológica foi realizada utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM-7001F, Jeol, Japão) com uma tensão de aceleração de 10 kV e recobrimento de ouro das partículas ME-CHX secas.

Formulação do adesivo

As ME-CHX foram adicionadas ao adesivo Adper™ Scotchbond™ Multiuso (3M ESPE, Estados Unidos) nas concentrações de 5% e 7,5% em massa. Um grupo foi mantido sem partículas para ser utilizado como controle. Todos os componentes foram pesados em uma balança analítica (AUW220D, Shimadzu,

Kyoto, Japão), ultrassonificados por 30 minutos, e, logo após, misturados utilizando-se de um Vórtex misturador por 4 minutos.

Grau de conversão

Os adesivos dos diferentes grupos (ME-CHX 0%, 5% e 7,5%) foram avaliados quanto ao grau de conversão (GC), por meio de espectroscopia de infravermelho (Vertex 70, BrukerOptics, Ettlingen, Alemanha) por transformada de Fourier, utilizando um dispositivo de reflectância total atenuada (Platinum ATR-QL, BrukerOptics, Ettlingen, Alemanha), composto por um cristal horizontal de diamante e um detector para captação do feixe refletido. O adesivo (n=3) foi dispensado diretamente sobre o cristal de ATR e fotoativado durante 20s, por diodo emissor de luz (Radii cal, SDI, Bayswater, Austrália). Foi utilizada uma matriz com dimensões de 3 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Os espectros foram obtidos antes e depois da fotoativação da amostra, utilizando programa específico (Opus 6.5, BrukerOptics, Ettlingen, Alemanha). O GC foi calculado, considerando a intensidade (altura do pico) da vibração das ligações duplas de carbono alifáticas em 1635 cm⁻¹ e ligações aromáticas carbono-carbono em 1610 cm⁻¹ das amostras polimerizadas e não polimerizadas a partir da seguinte equação:

$$GC = 1 - \frac{\text{absorbância (1640 cm}^{-1}\text{)} \cdot \text{absorbância (1610 cm}^{-1}\text{)} \text{ polímero}}{\text{absorbância (1640 cm}^{-1}\text{)} \cdot \text{absorbância (1610 cm}^{-1}\text{)} \text{ monômero}} \times 100$$

Citotoxicidade

A citotoxicidade foi realizada de acordo com a ISO 10993-5:2009, utilizando fibroblastos. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, nos quais foram mantidas 8 x 10⁴ células e amostras dos adesivos (3 mm de diâmetro e 1 mm de espessura) com as diferentes concentrações de microesferas (n=5). Poços contendo apenas as células foram mantidos como controle positivo. O cultivo celular foi feito em meio Dulbecco, modificado por Eagle (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As placas contendo as células e as amostras foram mantidas a 37 °C por 24 e 48h. Após esse período, foram adicionados 150 µl de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil brometo

de tetrazolina (MTT) a cada meio de cultura e foram novamente incubadas a 37 °C, por 3 h. Na sequência, foram adicionados 100 µl de dimetilsulfóxido para solubilizar os cristais de formazan formados a partir de MTT. A formação dos cristais de formazan indicam viabilidade celular, por representar a acumulação de MTT nas células por endocitose, que é um mecanismo fundamental das células vivas. A análise foi realizada por espectrofotometria, em um comprimento de onda de 540 nm.

Análise dos dados

Foi realizada uma análise descritiva do tamanho e morfologia das partículas. A distribuição dos dados dos demais ensaios foi analisada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Confirmada a normalidade na distribuição dos dados, os resultados obtidos nos ensaios de grau de conversão e citotoxicidade para as diferentes concentrações de microesferas nos adesivos foram comparados, utilizando ANOVA de uma via e Tukey. Todas as análises foram realizadas considerando-se um nível de significância de 5%, em software estatístico apropriado (SigmaPlot 12.0).

RESULTADOS

O tamanho médio das microesferas contendo clorexidina foi de 1,49 µm. A análise da morfologia através de MEV mostrou o aspecto esférico e aglomerado das partículas sobre o adjuvante de secagem, como pode ser visto na Figura 1.

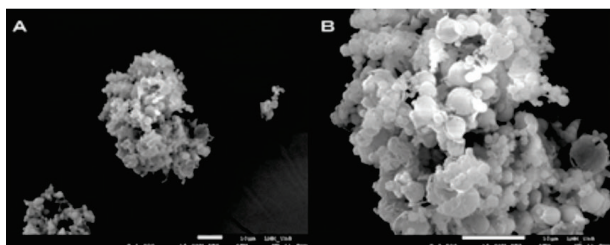


Figura 1. Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das ME-CHX, mostrando o aspecto aglomerado das partículas sobre o adjuvante de secagem. A. Em uma ampliação de 1000x. B. Em uma ampliação de 2500x.

Os resultados do grau de conversão estão na Tabela 1. O GC não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p=0,51$).

Tabela 1. Média e desvio padrão do grau de conversão (GC, %) dos adesivos contendo ME-CHX nas diferentes concentrações (0%, 5% e 7,5%).

Grupos	Grau de conversão (GC)
ME-CHX 0%	53,86 ± 2,87 ^A
ME-CHX 5%	56,89 ± 5,38 ^A
ME-CHX 7,5%	56,95 ± 0,61 ^A

Letras maiúsculas iguais indicam não haver diferença estatística na mesma coluna ($p<0,05$).

Os adesivos com diferentes concentrações de microesferas contendo CHX mantiveram a viabilidade celular acima de 80% após 24h e 48h de contato (Figura 2). Não houve diferença estatística para viabilidade celular entre o controle e os adesivos nas diferentes concentrações de ME-CHX em 24h ($p=0,18$) e 48h ($p=0,35$).

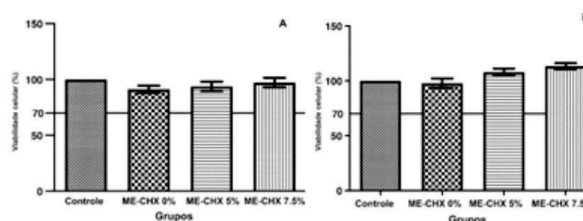


Figura 2. Viabilidade celular (em percentual, %) em contato, durante 24h (A) e 48h (B), com os adesivos contendo ME-CHX nas diferentes concentrações (0%, 5%, 7,5%) e controle positivo. O traçado em 70% representa o valor mínimo preconizado pela ISO. Não houve diferença entre os grupos em 24h ($p=0,18$) e 48h ($p=0,35$).

DISCUSSÃO

A CHX apresenta potencial de inibição de metaloproteinases, sendo utilizada como um agente para diminuir degradação da rede colágena³⁷. A aplicação de CHX é atualmente realizada após o condicionamento ácido e corresponde a mais uma etapa clínica.³² A incorporação das ME-CHX a um adesivo corresponde a uma proposta inédita no que tange a adesão dentinária contando com sistemas poliméricos de liberação controlada para atuar na inativação de MMPs a fim de preservar a camada híbrida a longo prazo.

As partículas poliméricas são compostas basicamente pelo agente ativo, polímero, solvente e coadjuvante de secagem, podem

ser produzidas por diferentes métodos, resultando em distribuições estreitas de diâmetros próximos a 1 μm .²⁰ O processo de formulação no presente estudo resultou em microesferas com tamanho médio de 1 μm , conforme demonstrado por difração a laser e confirmado microscopicamente. Pelo fato de a clorexidina possuir características hidrofílicas, partículas sem núcleo oleoso, conhecidas como microesferas¹⁷, foram formuladas.

Entre os polímeros mais usados estão a poli-caprolactona (PCL), polilactídeo (PLA), polilactídeo-co-glicolídeo (PLGA) e o Eudragit® S100. Neste estudo, assim como em trabalhos anteriores^{36,20,17,25}, o Eudragit® S100 foi utilizado como polímero para fabricação das partículas. O Eudragit® S100 pode ser utilizado como polímero para fabricação de partículas com ou sem núcleo oleoso.^{36,20,17,25} O uso desse polímero é preferível para a Odontologia pela compatibilidade com seus materiais resinosos por ser um copolímero de metacrilato.²⁵ Os metacrilatos têm seu uso fundamentado há mais de 30 anos em resinas odontológicas, sobretudo na forma do monômero base Bis-GMA (Bisfenol-A-Glicidil Metacrilato).^{22,35} Além do Bis-GMA, hidroxietilmetacrilato (HEMA) e sistemas iniciadores também participam da composição de adesivos, podendo ainda o copolímero do ácido polialquênico estar presente, como no adesivo utilizado neste trabalho.³⁵

Os sistemas adesivos convencionais de três passos são considerados padrão-ouro na Odontologia adesiva, o que justifica seu uso em estudos prévios assim como no presente trabalho.³⁵

A secagem por aspensão (spray-drying) para a conversão da formulação líquida em sistemas sólidos se faz necessária para facilitar a incorporação das partículas e manutenção das propriedades físico-químicas do adesivo resultante. Um adjuvante de secagem é necessário para possibilitar o processo evitando que as partículas venham a aderir ao equipamento.^{21,25} Os adjuvantes carboidratos como o Manitol são consolidados em diversas pesquisas, pela sua eficácia e estabilidade durante o processo.^{2,38} As partículas encontram-se aglomeradas sobre o adjuvante de secagem, como foi observado nas imagens de microscopia. Entretanto, partículas isoladas são observadas após a incorporação em

adesivo odontológico.²²

As propriedades superficiais e dimensionais das partículas determinam sua infiltração no tecido de interesse.³⁶ Nesse sentido, estudo prévio demonstrou nanopartículas contendo clorexidina em túbulos dentinários e entre as fibrilas de colágeno, com liberação gradual da clorexidina no interior dos túbulos.^{36,37} Pelo tamanho das microesferas obtidas no presente estudo, as partículas têm potencial de permear pelos túbulos dentinários,^{36,39} onde deve liberar a clorexidina, atingindo o objetivo dos sistemas de carreamento de fármacos.

Altas taxas de grau de conversão indicam menor quantidade de monômeros livres na matriz polimérica e propriedades físico-químicas satisfatórias do adesivo.¹¹ A incorporação de partículas na matriz resinosa pode interferir na conversão de monômeros em polímeros por dificultar a mobilidade da cadeia na fase de propagação da polimerização de metacrilatos.³ As concentrações das microesferas no adesivo não foram suficientes para interferir na polimerização da matriz resinosa, como pode ser visto pelos resultados de grau de conversão. O grau de conversão pode apresentar prejuízo quando a CHX é utilizada sem associação a uma partícula polimérica carreadora.⁹ Esses resultados de preservação do grau de conversão^{22,4,13,14,29} comprovam a vantagem de utilizar partículas carreadoras para incorporar CHX ao adesivo.

Por ter indicação odontológica, o adesivo deve apresentar baixa toxicidade. Embora o adesivo comercial utilizado seja considerado padrão-ouro, a incorporação de microesferas contendo clorexidina nesse material é inédita. O contato do material manteve alta viabilidade celular de acordo com a recomendação da ISO (ISO 10993-5), que indica valor mínimo de 70% de células viáveis para ser considerado um material seguro a ser utilizado na área da saúde. Estudos anteriores^{1,8} demonstraram semelhante viabilidade celular com o uso de diferentes partículas carreadoras de clorexidina. No entanto, quando a clorexidina livre foi incorporada ao material resinoso verificou-se citotoxicidade.⁹ Esses resultados confirmam o benefício da incorporação do agente ativo em partículas carreadoras na diminuição de efeitos adversos.

Além da redução de potenciais

efeitos adversos pelo controle na entrega e na dosagem da droga, os sistemas de liberação controlada melhoram a estabilidade, biocompatibilidade e biodisponibilidade do fármaco.^{18,20} Apesar dessas vantagens, o uso de sistemas carreadores de agentes ativos em Odontologia ainda é pouco explorado.¹⁸ A liberação controlada com efeito prolongado da CHX em sistemas adesivos tem potencial de garantir sua ação a longo prazo.^{13,14,21,22} Literatura prévia²² demonstra liberação controlada em sistemas adesivos, resultando em efeito desejado prolongado, mantendo satisfatoriamente suas propriedades físico-químicas e sua resistência de união.

CONCLUSÃO:

Com base nos resultados do presente estudo, é possível concluir que microesferas contendo clorexidina foram formuladas e incorporadas ao adesivo sem comprometer a polimerização do material e sem efeitos citotóxicos. Estudos futuros são necessários para comprovar a liberação controlada da clorexidina, além da resistência de união a longo prazo do adesivo com microesferas

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos a Amanda Naiara Fonseca, Rafaela Gazzi e toda a equipe do Núcleo de Terapias Nanotecnológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio na preparação das microesferas. Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

REFERÊNCIAS:

1. Akram Z, Daood U, Aati S, Ngo H, Fawzy AS. Formulation of pH-sensitive chlorhexidine-loaded/mesoporous silica nanoparticles modified experimental dentin adhesive. *Mater Sci Eng C*. 2021; 122:111894.
2. Andrade DF de, Vukosavljevic B, Benvenuti EV, Pohlmann AR, Guterres SS, Windbergs M, et al. Redispersible spray-dried lipid-core nanocapsules intended for oral delivery: the influence of the particle number on redispersibility. *Pharm Dev Technol*. 2017; 23(4):414–25.
3. Andrzejewska E. Photopolymerization kinetics of multifunctional monomers. *Prog Polym Sci*. 2001; 26(4):605–65.
4. Boaro LCC, Campos LM, Varca GHC, dos Santos TMR, Marques PA, Sugii MM, et al. Antibacterial resin-based composite containing chlorhexidine for dental applications. *Dent Mater*. 2019; 35(6):909–18.
5. Breschi L, Maravic T, Comba A, Cunha SR, Loguercio AD, Reis A, et al. Chlorhexidine preserves the hybrid layer in vitro after 10-years aging. *Dent Mater*. 2020; 36(5):672–80.
6. 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. *Dent Mater*. 2010; 26(4):320–5.
7. 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. *Dent Mater*. 2009; 25(10):1269–74.
8. Cai X, Wang X. Chlorhexidine-loaded poly (amido amine) dendrimer and a dental adhesive containing amorphous calcium phosphate nanofillers for enhancing bonding durability. *Dent Mater*. 2022; 38(5):824–34.
9. Campos KPL, Viana GM, Cabral LM, Portela MB, Hirata Junior R, Cavalcante LM, et al. Self-cured resin modified by quaternary ammonium methacrylates and chlorhexidine: Cytotoxicity, antimicrobial, physical, and mechanical properties. *Dent Mater*. 2020; 36(1):68–75.
10. 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):90–4.
11. Collares FM, Ogliaeri FA, Zanchi CH, Petzhold CL, Piva E, Samuel SM. Influence of 2-hydroxyethyl methacrylate concentration on polymer network of adhesive resin. *J Adhes*

Dent. 2011; 13(2):125–9.

12. 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. *Journal of Dental Research*. 2005; 84(2):118–32.

13. Degrazia FW, Genari B, Castelo V, Arthur RA, Arias S, Maria S, et al. Polymerisation, antibacterial and bioactivity properties of experimental orthodontic adhesives containing triclosan-loaded halloysite nanotubes. *J Dent*. 2018; 69:77–82.

14. Degrazia FW, Leitune VCB, Garcia IM, Arthur RA, Samuel SM, Collares FM. Effect of silver nanoparticles on the physicochemical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive. *J Appl Oral Sci*. 2016; 24(4):404–10.

15. Demarco FF, Collares K, Correa MB, Cenci MS, Moraes RR de, Opdam NJ. Should my composite restorations last forever? Why are they failing? *Braz oral res*. 2017; 31(suppl 1):e56.

16. Demarco FF, Corrêa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJM. Longevity of posterior composite restorations: Not only a matter of materials. *Dental Materials*. 2012; (1):87–101.

17. Domingues GS, Guterres SS, Beck RCR, Pohlmann AR. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Quím Nova*. 2008; 31(8):1966–72.

18. Dornelles NB, Collares FM, Genari B, de Souza Balbinot G, Maria S, Rodrigo Alex Arthur, et al. Influence of the addition of microsphere load amoxicillin in the physical, chemical and biological properties of an experimental endodontic sealer. *J Dent*. 2018; 68:28–33.

19. Fonseca BM da, Pleffken PR, Balducci I, Tay F, Pucci CR, Araujo MAM. New Trends in Dentin Bonding: Treatment with chlorhexidine, hyaluronic acid, vitamin C and green tea. *Braz Dent Sci*. 2013; 16(3):56–62.

20. Frank LA, Contri RV, Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2015; 7(5):623–39.

21. Genari B, Leitune VCB, Jornada DS, Camassola M, Arthur RA, Pohlmann AR, et al. Antimicrobial effect and physicochemical properties of an adhesive system containing nanocapsules. *Dent Mater*. 2017; 33(6):735–42.

22. Genari B, Leitune VCB, Jornada DS, Camassola M, Pohlmann AR, Guterres SS, et al. Effect of indomethacin-loaded nanocapsules incorporation in a dentin adhesive resin. *Clin Oral Investig*. 2016;21(1): 437–46.

23. Göstemeyer G, Schwendicke F. Inhibition of hybrid layer degradation by cavity pretreatment: Meta- and trial sequential analysis. *J Dent*. 2016; 49:14–21.

24. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine Arrests Subclinical Degradation of Dentin Hybrid Layers in vivo. *J Dent Res*. 2005; 84(8):741–6.

25. Jain D, Panda AK, Majumdar DK. Eudragit S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2005; 6(1): E100–7.

26. Josic U, Maravic T, Mazzitelli C, Del Bianco F, Mazzoni A, Breschi L. The effect of chlorhexidine primer application on the clinical performance of composite restorations: a literature review. *J Esthet Restor Dent*. 2020; 33(1):69–77.

27. K Vallabhdas A, Kabbinala P, Nayak R, Rajakumari M, Shilpa T. Evaluation of Hybrid Layer and Bonding Interface after Water Storage with and without the Usage of 2% Chlorhexidine: A Scanning Electron Microscope Study. *J Contemp Dent Pract*. 2018;19(1):52–9.

28. Kalagi S, Feitosa S, Münchow EA, Martins VM, Karczewski A, Cook NB, et al. Chlorhexidine-modified nanotubes and their

- effects on the polymerization and bonding performance of a dental adhesive. *Dent Mater.* 2020; 36(5):687–97.
29. Machado AHS, Garcia IM, da Motta AS, Leitune VCB, Collares FM. Triclosan-loaded chitosan as antibacterial agent for adhesive resin. *J Dent.* 2019; 83:33–9.
30. Mazzoni A, Pashley D, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* 2006; 27(25):4470–6.
31. Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of Etch-and-Rinse and Self-etch Adhesives on Dentine MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res.* 2012; 92(1):82–6.
32. Moon PC, Weaver J, Brooks CN. Review of Matrix Metalloproteinases' Effect on the Hybrid Dentin Bond Layer Stability and Chlorhexidine Clinical Use to Prevent Bond Failure. *Open Dent J.* 2010; 4:147–52.
33. Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N. Hybrid Layer as a Dentin-Bonding Mechanism. *J Esthet Restor Dent.* 1991; 3(4):133–8.
34. Opdam NJM, van de Sande FH, Bronkhorst E, Cenci MS, Bottenberg P, Pallesen U, et al. Longevity of Posterior Composite Restorations. *J Dent Res.* 2014; 93(10):943–9.
35. 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(9):864–81.
36. Priyadarshini BM, Selvan ST, Lu TB, Xie H, Neo J, Fawzy AS. Chlorhexidine Nanocapsule Drug Delivery Approach to the Resin-Dentin Interface. *J Dent Res.* 2016; 95(9):1065–72.
37. Priyadarshini BM, Mitali K, Lu TB, Handral HK, Dubey N, Fawzy AS. PLGA nanoparticles as chlorhexidine-delivery carrier to resin-dentin adhesive interface. *Dent Mater.* 2017; 33(7):830–46.
38. Santos VE, Gomes Lyra JD, Silva MB, Heimer M, Rosenblatt A. Mecanismo de ação da clorexidina sobre as enzimas metaloproteínas e sua repercussão clínica: um estudo de revisão. *RFO UPF.* 2017; 21(3).
39. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas L de L, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím Nova.* 2003; 26(5):726–37.
40. Tay FR, Moulding KM, Pashley DH. Distribution of nanofillers from a simplified-step adhesive in acid-conditioned dentin. *J Adhes Dent.* 1999; 1(2):103–17.