



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MARÍLIA MOTA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA
DO COLÁGENO E DO TRATAMENTO COM CLOREXIDINA DA
DENTINA
NA RESISTÊNCIA ADESIVA**

FORTALEZA
2010

MARÍLIA MOTA SILVA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA DO COLÁGENO E DO TRATAMENTO COM CLOREXIDINA DA DENTINA NA RESISTÊNCIA ADESIVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como um dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto de Oliveira Fernandes.

FORTALEZA
2010

S581a Silva, Marília Mota

Avaliação *in vitro* do efeito da desnaturação térmica do colágeno e do tratamento com clorexidina da dentina na resistência adesiva/ Marília Mota Silva. – Fortaleza, 2010.

44 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto de Oliveira Fernandes
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Fortaleza, Ceará.

1. Clorexidina 2. Adesivos Dentinários 3. Desnaturação Protéica I.
Fernandes, Carlos Augusto de Oliveira (orient.) II. Título.

CDD:617.695

MARÍLIA MOTA SILVA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA DESNATURAÇÃO TÉRMICA DO COLÁGENO E DO TRATAMENTO COM CLOREXIDINA DA DENTINA NA RESISTÊNCIA ADESIVA

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Augusto de Oliveira Fernandes (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça

Universidade de Fortaleza - UNIFOR

*Ao meu pai, **Lúcio**, que é o meu maior ídolo, meu exemplo de vida. O homem mais inteligente que eu conheço e de uma simplicidade e humildade invejável. Um homem batalhador, que sempre conquistou tudo com muito esforço e muita garra e por isso é a minha maior inspiração. O meu maior incentivador, que sempre me deu apoio e esteve ao meu lado em todos os momentos.*

*A minha mãe **Joselene**, que sempre foi minha melhor amiga e conselheira. Que participou intensamente de todos os momentos da minha vida. Que me apóia, me fortalece e me conforta na busca da realização de todos os meus sonhos. A mulher mais importante da minha vida e que eu tenho um amor infinito e incondicional.*

*Ao meu marido, **Anastácio**, pela paciência e compreensão. Meu incentivador, companheiro e amigo que sempre está ao meu lado e através de seu amor e carinho me estimula a seguir em frente e superar todas as dificuldades.*

Aos meus familiares e amigos que sempre me deram apoio e carinho. Que me estimulam e se alegram com as minhas conquistas.

*Com muito carinho,
Dedico.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus, que me deu a vida, que sempre está ao meu lado, iluminando meu caminho e me ajudando a realizar todos os meus sonhos. Obrigada Senhor, por todas as graças que eu recebi em minha vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto de Oliveira Fernandes, professor do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, meu querido e dedicado Orientador, que me acompanhou desde o início desta caminhada, que soube tão bem repassar seus conhecimentos e suas experiências. Muito obrigada Professor, por toda paciência e dedicação, obrigada pelo incentivo e pelo apoio nos momentos mais difíceis, obrigada pelos conselhos, pela amizade e pelo carinho demonstrado.

Ao grupo de Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará pelo empenho em favor do nosso crescimento, pelos ensinamentos deixados, pela garra e determinação que todos nós alunos, devemos reconhecer.

*Aos colegas de turma do mestrado, Alrieta Henrique Teixeira, Ana Patrícia Souza de Lima, André Mattos Brito de Souza, Daniela da Silva Bezerra, Françoise Parahyba Dias, Gabriela Eugênio de Sousa Furtado, George Tácio Miranda Candeiro, Isabela Alves Pacheco, Jorgeana Abraão Barroso, José Luciano Pimenta Couto, Maria Denise Rodrigues de Moraes, Mirela Andrade Campos, Regina Cláudia Ramos Colares, Saulo Hilton Botelho Batista e Virgínia Régia Souza da Silveira, pela amizade, pelo incentivo, pela convivência e companheirismo demonstrados durante o nosso curso de mestrado. Vocês são muito especiais. Encontrei verdadeiros amigos. Agradeço também a amiga **Fabianni Magalhães Apolonio** pela amizade e boas risadas compartilhadas durante os experimentos de microtração.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, na pessoa de seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Jesualdo Pereira Farias**.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, na pessoa de sua diretora, **Prof. Dra. Neiva Francenely Cunha Vieira**.

Ao Curso de Odontologia, na pessoa de sua coordenadora, **Prof. Dra. Maria Eneide Leitão de Almeida** e do Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia **Prof. Dr. Sergio Lima Santiago**.

Ao **Prof. Dr. Renato Maia** que doou os dentes utilizados durante a pesquisa.

Ao Laboratório de Caracterização de Materiais (LACAM) da Universidade Federal do Ceará na pessoa do **Prof. Luis Flávio Gaspar Herculano**.

A faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade de Fortaleza, em nome da coordenadora do curso **Prof. Lúcia Maria Barbosa Oliveira** por ter permitido a utilização do laboratório e pela colaboração durante os experimentos.

Ao **Prof. Dr. Paulo César de Almeida** que colaborou durante a análise estatística dos resultados obtidos.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudo para a realização do mestrado.
A todos aqueles que de alguma forma contribuíram, com uma palavra amiga, um abraço fraterno, um sorriso franco, meus sinceros agradecimentos.

Viver e não ter a vergonha de ser feliz

Cantar e cantar e cantar

A beleza de ser um eterno aprendiz...

Gonzaguinha

RESUMO

Os sistemas adesivos atuais promovem uma imediata e eficaz resistência de união com os substratos dentais. Entretanto, ao longo do tempo, pode haver uma degradação desse processo, influenciando negativamente na manutenção dos valores de resistência. O digluconato de clorexidina (CHX) tem seu emprego difundido na odontologia como um agente antimicrobiano, entretanto além da ação desinfetante, ele tem sido estudado para manter a estabilidade da resistência adesiva. Por outro lado, alguns autores têm considerado a hipótese de que as fibras de colágeno podem não ser tão importantes para a união micromecânica entre dentina e resina composta, já que existem evidências de que o próprio condicionamento com ácido fosfórico pode levar a uma mudança na estrutura molecular das fibras, podendo desnaturá-las. Este estudo tem por objetivo avaliar a resistência adesiva entre sistema adesivo e dentina, utilizando um sistema adesivo convencional, em função do tempo e dos tratamentos que serão empregados: desnaturação das fibras de colágeno e aplicação do CHX previamente ao sistema adesivo. Para isto foram utilizados 30 terceiros molares humanos que tiveram a dentina superficial exposta, seguido do condicionamento com ácido fosfórico e divididos em três grupos. O grupo controle e grupo CHX foram imersos em água a 37°C durante 10 minutos e o grupo desnaturação em água a 50°C durante 10 minutos. O grupo controle e desnaturação foram tratados de acordo com as instruções dos fabricantes e o grupo CHX com clorexidina a 2% após o condicionamento ácido e antes da aplicação do sistema adesivo. Os espécimes ficaram armazenados em água destilada a 37°C e, posteriormente cortados, obtendo-se espécimes em forma de palitos que foram testados nos períodos de 24h e 6 meses. Os espécimes foram tracionados até a ruptura da união a uma velocidade de 1mm/min e sua força de união mensurada. O modo de fratura foi observado utilizando microscopia ótica com 40X de aumento. Os dados da resistência de união foram estatisticamente analisados usando os testes de Kolmogorov-Smirnov, Levine, F de Snyder, Turkey e T de Student. Os resultados da microtração mostraram que o grupo controle, o grupo tratado com CHX e o grupo desnaturado, tiveram uma redução significativa da resistência ($p < 0,05$) após 6 meses. Entretanto o percentual dessa redução do grupo CHX foi de apenas 16,08%, enquanto o grupo controle teve 27,27% e o grupo desnaturado 28,58%. Observa-se uma queda da resistência menor no grupo CHX, quando comparado aos outros 2 grupos. A degradação da camada híbrida foi significativa no período de 6 meses nos dois tratamentos utilizados, embora o grupo CHX tenha apresentado uma melhor performance. A desnaturação térmica das fibras de colágeno não influenciou a resistência adesiva.

Palavras-chave: Fibras de Colágeno. Adesivos Convencionais. Digluconato de Clorexidina. Desnaturação Térmica. Resistência Adesiva.

ABSTRACT

The current adhesive systems promote an immediate and effective bond strength to dental substrates, however, over time, there may be a degradation of that process, impacting negatively on the maintenance of resistance values. Chlorhexidine digluconate (CHX) its widespread use in dentistry as an antimicrobial agent, however beyond acting disinfectant, it has been studied to maintain the stability of the bond strength. On the other hand, some authors have considered the hypothesis that the collagen fibers may not be as important for micromechanical union between dentin and composite resin, since there is evidence that the phosphoric acid itself can lead to a change in the structure molecular fibers, which can denature them. The aim of this study was evaluate the effect of thermal collagen denaturation and 2% chlorhexidine (CHX) application on resin-dentin bond strength in teeth restored with conventional adhesive. The study sample consisted of 30 human third molars, of which the dentin was exposed followed by phosphoric acid etching. The specimens were distributed in three main groups (CHX, thermal denaturation and control). Thermal denaturation consisted of immersion in water at 50°C for 10 minutes. Control and thermal denaturation groups was costumarily restored and CHX group was treated with 2% chlorhexidine after acid etching and before bonding. The specimens were stored in distilled water at 37°C for 24 hours or 6 months and then sectioned into sticks which were submitted to tensile bond testing at a crosshead speed of 1mm/min. The bond failure mode was observed by microscopy (40X). The results of the tensile bond test were expressed in MPa and analyzed with the tests of Kolmogorov-Smirnov, Levine, Snyder F, Tukey and Student *t*. In all groups bond strength decreased significantly over 6 months ($p < 0.05$), but the loss of bond strength was smaller in the CHX group (16,08%) than in the control group (27,27%) and the thermal denaturation group (28,58%). The hybrid layer was extensively degraded over a period of 6 months. However, treatment with CHX reduced loss of bond strength in relation to controls. Thermal denaturation of collagen fibrils did not affect bond strength.

Keywords: Collagen. Etch-and-Rinse. Adhesives. Chlorhexidine. Termal Denaturation. Bond Sstrength.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	PROPOSIÇÃO.....	17
2.1	Objetivos gerais.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	CAPÍTULO.....	18
3.1	Capítulo 1: <i>In vitro</i> evaluation of the effect of thermal collagen denaturation and chlorhexidine application on resin-dentin bond strength.....	18
4	CONCLUSÃO GERAL.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	APÊNDICES.....	44

1 INTRODUÇÃO GERAL

Uma união resistente e duradoura entre sistemas adesivos e os substratos dentais é o que se deseja na realização de procedimentos restauradores. Essa união tem por objetivo propiciar não apenas uma adequada retenção micromecânica do material aos preparos cavitários, mas também enquadrá-la nos aspectos estéticos e biológicos requeridos (SILVEIRA, 2003)

As resinas compostas são materiais restauradores bastante utilizados devido as suas boas propriedades mecânicas e estéticas. As restaurações feitas com elas devem resistir à sua contração de polimerização, às forças mastigatórias e ao ambiente bucal em que ficarão expostas, onde existe umidade, variações de temperatura e acidez/alcalinidade. Tais restaurações devem também favorecer um adequado selamento marginal, reduzindo os riscos de microinfiltração e agressão pulpar (HANDELMAN; SHEY, 1996).

Enquanto a união dos materiais adesivos ao esmalte dentário resulta em um procedimento clínico seguro, à dentina mostra-se difícil de ser efetivamente obtida em função da composição e estrutura desse tecido (CARVALHO *et al.*, 2004).

A água está presente principalmente dentro dos túbulos dentinários. O número e o diâmetro dos túbulos variam de acordo com a proximidade da polpa e de sua localização no dente, são mais freqüentes e com diâmetros maiores na dentina profunda. Cada túbulo está envolvido por dentina peritubular, que é extremamente mineralizada, composta principalmente por hidroxiapatita. Entre os túbulos encontra-se a dentina intertubular, constituída essencialmente de fibras de colágeno envolvidas por cristais de apatita. (AVERY, 1989).

Este colágeno é caracterizado pelo seu aspecto fibrilar, sendo constituído de moléculas alongadas de disposição helicoidal, que estão unidas por ligações cruzadas (CARVALHO, 2002).

Sua molécula básica é formada por um grupo de três cadeias polipeptídicas, cada uma composta por uma série de mil aminoácidos. Quimicamente, os três principais aminoácidos encontrados são a prolina, a hidroxiprolina e a glicina, os quais perfazem cerca de 70% do total (CARVALHO, 2002).

O processo de união entre materiais resinosos e a dentina está baseado principalmente em três passos fundamentais: condicionamento ácido, aplicação do *primer* (monômeros e solventes orgânicos) e do adesivo à base de resina. Este mecanismo envolve essencialmente o processo de remoção de minerais dos tecidos dentais e aplicação de

monômeros resinosos, que resultam na união micromecânica pelas porosidades criadas e na formação da camada híbrida. (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982). Nesta formação ocorre o entrelaçamento ao nível molecular do sistema adesivo dentro da rede de colágeno (NAKABAYASHI; PASHLEY, 2000a).

Para a formação da camada híbrida é necessário o condicionamento ácido do substrato. Na dentina, este é necessário para remover a *smear layer* (lama dentinária) e aumentar a porosidade intertubular, conseguida pela dissolução da hidroxiapatita, que é um componente com alta energia de superfície e facilmente removida nesta fase. Após o condicionamento ácido, resulta apenas colágeno (de baixa energia de superfície) e água (NAKABAYASHI; PASHLEY, 2000b). O resultado será um substrato de maior porosidade e baixa energia de superfície. Haverá então a necessidade de aplicar uma substância, no caso o *primer* que recupera a energia superficial perdida e facilita a infiltração dos monômeros resinosos (ELIADES, 1994).

O *primer* consiste de uma solução de monômeros em solventes orgânicos, geralmente etanol ou acetona, e deve ser aplicado após o condicionamento ácido (PERDIGÃO; RITTER, 2001). O solvente (etanol ou acetona) deve se misturar com a água presente entre as fibras colágenas, retirando-a no processo de evaporação. Os monômeros orgânicos se infiltram nos espaços interfibrilares da trama de colágeno e após a polimerização forma-se a camada híbrida (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982).

Os *primers* promovem uma tensão superficial adequada para a interação com o adesivo hidrófobo (resina fluida), ou seja, eles transformam a condição hidrófila da dentina em hidrófoba devido às características de sua composição. O adesivo hidrófobo teria a função de estabilizar a camada híbrida, promovendo sua conexão com a resina composta restauradora (VAN MEERBEEK *et al.*, 1998; LI; BURROW; TYAS, 2000).

A camada híbrida pode ser produzida mediante diferentes técnicas, utilizando sistemas adesivos variados. Existem várias formas de classificá-los. Neste trabalho adotaremos uma classificação que divide os sistemas adesivos inicialmente em adesivos convencionais e autocondicionantes. Os convencionais são os sistemas que empregam o passo operatório de condicionamento ácido da superfície de esmalte e/ou dentina separadamente dos outros passos. Estes podem ser divididos em: Convencional de três passos (ácido, *primer* e adesivo em etapas distintas) e de dois passos (ácido, *primer* e adesivo, sendo os dois últimos em um frasco único). Os sistemas adesivos autocondicionantes diferem dos convencionais porque não requerem a aplicação isolada de um ácido. Estes incorporam em sua formulação monômeros resinosos ácidos que simultaneamente desmineralizam e infiltram os tecidos

dentais. Os sistemas autocondicionantes podem ser divididos em: de dois passos (*primer* ácido e adesivo aplicados separadamente sobre o substrato) e passo único (*primer* ácido e adesivo aplicados em um único passo operatório) (CARVALHO *et al.*, 2004).

A maioria dos sistemas adesivos comercializados alcança alta resistência de união imediatamente após a fotopolimerização da resina composta (BURROW *et al.*, 1994). Entretanto, a longevidade da resistência de união entre sistemas adesivos e dentina é um campo de grande interesse atual na dentística restauradora (SANO *et al.*, 1999).

Considerando evidências acumuladas na última década, baseadas tanto em trabalhos *in vitro* quanto *in vivo*, a resistência de união entre dentina e adesivos à base de resina pode não ser tão durável quanto se presumia (DE MUNCK *et al.*, 2003). Esta diminuição da resistência de união pode ser atribuída à degradação da camada híbrida na interface adesivo-dentina (WANG; SPENCER, 2005).

Pashley *et al.* (2004) relataram que a deterioração das fibras de colágeno da dentina contribui para o mecanismo responsável pela degradação da interface adesiva.

Neste contexto, o processo adesivo com condicionamento prévio com ácido desprotege as fibras de colágeno, tornando-as vulneráveis à degradação pelas metaloproteinases (MMPs) endógenas (SULKALA *et al.*, 2002).

Nos mamíferos, as metaloproteinases (MMPs) formam um grupo de 23 enzimas capazes de degradar os componentes da matriz extracelular. A dentina humana contém pelo menos a collagenase (MMP-8), gelatinase (MMP-2 e 9) e enamelisina (MMP-20) (SULKALA *et al.*, 2002).

A degradação do colágeno pela atividade das enzimas degradadoras collagenase e gelatinase é completamente inibida com a utilização de proteases inibidoras, quando incorporadas para preservar a integridade estrutural das fibras colágenas (PASHLEY *et al.*, 2004). Neste estudo de Pashley, o ataque ácido, utilizando ácido fosfórico reduziu, mas não conseguiu inibir completamente a atividade da collagenase na dentina mineralizada. Por outro lado, o uso do digluconato de clorexidina, mesmo que em baixas concentrações, conseguiu uma inibição bastante superior.

A clorexidina é uma biguanidina com propriedades catiônicas. A molécula é simétrica com 2 anéis, 4 cloro-fenil e 2 grupos etano pentânicos ligados por uma cadeia central do hexametileno (FARDAL; TURNBULL, 1986).

O digluconato de clorexidina tem seu emprego difundido na odontologia como um agente antimicrobiano. Além da ação desinfetante, o digluconato de clorexidina também funciona como um potente inibidor das metaloproteinases (GENDRON *et al.*, 1999).

Este efeito inibidor das metaloproteinases (MMPs) pelo digluconato de clorexidina, foi recentemente demonstrado em um estudo *in vitro*. Quando a clorexidina foi aplicada após o condicionamento ácido, a resistência adesiva, após 6 (seis) meses, foi significativamente superior ao grupo controle (CARRILHO *et al.*, 2007a). Breschi *et al.* (2009), corroboram com estes dados e acreditam que o uso de clorexidina pode prevenir a degradação do colágeno ao longo do tempo. Em um estudo *in vivo*, o grupo experimental que utilizou o digluconato de clorexidina após o ataque ácido, mostrou a camada híbrida normal após seis meses e o grupo controle mostrou a degradação evidente da camada híbrida no mesmo período (HEBLING *et al.*, 2005). Outro recente estudo *in vivo* demonstrou que após 14 meses ocorreu uma diminuição de 38% da resistência adesiva do grupo controle, enquanto o grupo em que foi aplicado o digluconato de clorexidina manteve os mesmos valores iniciais (CARRILHO *et al.*, 2007b). Brackett *et al.* (2009), encontraram resultados semelhantes após 12 meses.

Apesar da utilização da CHX por 60 segundos após o condicionamento ácido trazer vantagens, significa mais um passo clínico a ser realizado, podendo representar um obstáculo, pois os clínicos desejam a simplificação da técnica (TAY; PASHLEY, 2003). Além disso, a técnica do condicionamento ácido total é bastante sensível aos procedimentos adesivos. Por estes motivos, tem sido estudado sobre a verdadeira importância das fibras de colágeno no processo de adesão entre dentina e materiais adesivos (VARGAS; COBBS; ARMSTRONG *et al.*, 1997; MAIOR *et al.*, 2007).

Alguns autores também têm discutido sobre mudanças morfológicas das fibras de colágeno que podem estar associadas com o condicionamento ácido na superfície de dentina (ELIADES; PALAGHIAS; VOUGIOUKLAKIS, 1997), sugerindo que o ácido fosfórico pode promover uma desnaturação dessas fibras (EL FENINAT *et al.*, 1998; OKAMOTO, 1985). A desnaturação do colágeno através do ácido foi demonstrada após 15 segundos de condicionamento com ácido fosfórico a 35% (SPENCER *et al.*, 2001). Eliades, Palaghias e Vougiouklakis (1999) relataram que cerca de 50% das fibras de colágeno apresentam-se desnaturadas após o condicionamento ácido. O condicionamento ácido também pode aumentar a sensibilidade do colágeno da dentina à ação hidrolítica da tripsina, tornando-o mais susceptível à sua ação quando desnaturado (OKAMOTO *et al.*, 1991; AGEE; ZHANG; PASHLEY, 2000).

Em uma perspectiva clínica e funcional, a questão não é em quanto tempo o ácido desnatura o colágeno da dentina, mas a relação entre a desnaturação do colágeno e as propriedades funcionais do processo adesivo, avaliando o comportamento das fibras de colágeno da dentina frente às diferentes situações.

A desnaturação protéica pode ocorrer por fatores físicos e químicos que incluem temperatura, pH e pressão (HUANG; DONG, 2003).

Em alguns procedimentos clínicos pode ocorrer um aumento de temperatura nos substratos dentais, principalmente na dentina, tais como: o uso de instrumentos de alta rotação, utilizando pobre irrigação e durante a condensação vertical da gutta-percha, onde a temperatura pode atingir até 300°C. Estas temperaturas são suficientes para causar a desnaturação da matriz de dentina mineralizada ou parcialmente desmineralizada (BIGI *et al.*, 2002; ARMSTRONG *et al.*, 2008). Após o condicionamento ácido da dentina, as fibras de colágeno desmineralizadas que ainda se apresentam intactas, ficam mais susceptíveis a desnaturação térmica (ARMSTRONG *et al.*, 2006).

A desnaturação das fibras colágenas através do calor ocorre quando submetida a temperaturas superiores a 43°C em água aquecida (FRIESS; LEE; GROVES, 1996; MILES *et al.*, 2005).

Aparentemente a ruptura das moléculas de colágeno, causando sua desnaturação, é consequência da agitação térmica da água. Acredita-se que ocorra em dois passos: separação das três cadeias polipeptídicas que se encontram originalmente em disposição helicoidal, resultando em cadeias individuais, e em seguida degradação dessas cadeias individuais em espirais aleatórias (ROCHDI; FOUCAT; RENO, 1999). O primeiro passo envolve a ruptura das pontes de hidrogênio entre as três cadeias polipeptídicas, dando origem a moléculas de tropocolágeno. O segundo passo a ruptura das pontes de hidrogênio dentro de cada cadeia (LUESCHER; RUEGG; SCHINDLER, 1974). Estas ligações interpeptídicas são estáveis, porém podem romper com mudanças de temperatura.

A integridade do processo adesivo envolvendo as fibras de colágeno e um sistema adesivo infiltrado e polimerizado é responsável pelo desempenho clínico das restaurações adesivas.

A resistência adesiva pode ser avaliada e mensurada através de testes mecânicos. No ensaio de microtração um corpo-de-prova é submetido a uma força de velocidade constante e intensidade crescente que traciona até a sua ruptura, que pode ser coesiva dos

substratos ou adesiva nas interfaces. Geralmente, o ensaio é realizado em um corpo-de-prova de formas e dimensões padronizadas, para que os resultados obtidos possam ser comparados ou, se necessário, reproduzidos. Este corpo-de-prova é fixado numa máquina de ensaio que aplica esforços crescentes na sua direção axial, sendo medidas as deformações correspondentes. Os esforços ou cargas são medidas na própria máquina, e, normalmente, o ensaio ocorre até a ruptura da interface adesiva e/ou substratos (PASHLEY *et al.*, 1995).

Baseado na hipótese de que o digluconato de clorexidina, por seu efeito inibidor das MMPs, preserva a camada híbrida e desacelera a perda da resistência adesiva, este estudo foi elaborado para avaliar a resistência de união dos sistemas adesivos quando utilizado este produto após o condicionamento ácido.

Em uma série de experimentos, este estudo também avaliará a ocorrência de alteração da resistência adesiva quando os espécimes forem submetidos à temperatura de 50°C em água, isto é, haverá uma desnaturação das fibras de colágeno induzida por calor.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos gerais

- Avaliar a resistência de união entre sistema adesivo e dentina em função do tratamento prévio com digluconato de clorexidina e tratamento térmico das fibras de colágeno.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da aplicação prévia do digluconato de clorexidina nos valores de resistência de união.

- Avaliar os efeitos da desnaturação térmica das fibras de colágeno na resistência de união entre sistema adesivo e dentina.

- Avaliar a resistência adesiva entre sistema adesivo e dentina nos períodos imediato e em seis meses.

3 CAPÍTULO

Esta dissertação esta baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e permite a inserção de artigos científicos de autoria e co-autoria do candidato. Por se tratarem de pesquisas envolvendo seres humanos, ou parte deles, o projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob protocolo nº 109/08. (Anexo A). Assim sendo, esta dissertação de mestrado é composta de um capítulo que contém um artigo que será submetido para publicação no periódico “Journal of Dentistry”.

3.1 Capítulo 1: In vitro evaluation of the effect of thermal collagen denaturation and chlorhexidine application on resin-dentin bond strength

Silva MM, Almeida PC Fernandes CAO.

***In vitro* evaluation of the effect of thermal collagen denaturation
and chlorhexidine application on resin-dentin bond strength**

MARÍLIA MOTA SILVA^a, PAULO CÉSAR DE ALMEIDA^b, CARLOS AUGUSTO DE OLIVEIRA FERNANDES^c.

^a Postgraduate Student, Graduate School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^b Assistant Professor, Faculty of Nursing and Faculty of Nutrition, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^c Associate Professor, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Full address of author to whom correspondence should be sent:

Carlos Augusto de Oliveira Fernandes

Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem

Rua Cap. Francisco Pedro S/N

Bairro – Rodolfo Teófilo – CEP 60430-170

Phone - #558533668232

Fax - #558533668410

Fortaleza-CE-Brazil

E-mail: caugusto@ufc.br

Keywords: *etch-and-rinse* adhesives, chlorhexidine, collagen, thermal denaturation, bond strength.

Declaration of interests

The authors declare that there is no potential conflict of interest identified in this study.

***In vitro* evaluation of the effect of thermal collagen denaturation and chlorhexidine application on resin-dentin bond strength**

Summary

Objective: Evaluate the effect of thermal collagen denaturation and 2% chlorhexidine (CHX) application on resin-dentin bond strength in teeth restored with conventional adhesive.

Methods: The study sample consisted of 30 human third molars, of which the dentin was exposed followed by phosphoric acid etching. The specimens were distributed in three main groups (CHX, thermal denaturation and control). Thermal denaturation consisted of immersion in water at 50°C for 10 minutes. Control and thermal denaturation groups was customarily restored and CHX group was treated with 2% chlorhexidine after acid etching and before bonding. The specimens were stored in distilled water at 37°C for 24 hours or 6 months and then sectioned into sticks which were submitted to tensile bond testing at a crosshead speed of 1mm/min. The bond failure mode was observed by microscopy (40X). The results of the tensile bond test were expressed in MPa and analyzed with the tests of Kolmogorov-Smirnov, Levine, Snyder F, Tukey and Student *t*.

Results: In all groups bond strength decreased significantly over 6 months ($p < 0.05$), but the loss of bond strength was smaller in the CHX group (16.08%) than in the control group (27.27%) and the thermal denaturation group (28.58%).

Conclusion: The hybrid layer was extensively degraded over a period of 6 months. However, treatment with CHX reduced loss of bond strength in relation to controls. Thermal denaturation of collagen fibrils did not affect bond strength.

Introduction

Recent advances in esthetic restoration has popularized the use of composite resin in restoratives procedures of both anterior and posterior teeth. However, adhesives present a range of limitations, especially in relation to their resistance to wear from mastication and their ability to maintain a lasting bond with the dental structure.¹

The mechanism of adhesive-dentin bonding involves hydrophilic monomer infiltration of the collagen fibrils exposed after acid etching, forming the so-called hybrid layer.²

Most commercially available adhesive systems attain high bonding strength immediately after light curing.³ However, studies *in vitro*⁴ and *in vivo*⁵⁻⁷ have shown that the bond between adhesive and dentin may not be as durable as previously assumed. Loss of bond strength may follow deterioration of the hybrid layer⁸ probably due to collagen hydrolysis by matrix metalloproteinases (MMPs) in the dentin.⁹ MMPs are capable of degrading all types of extracellular matrix proteins. Four MMPs have so far been identified in human dentin: collagenase (MMP-8), gelatinase (MMP-2 and MMP-9) and enamelysin (MMP-20).¹⁰

MMPs may be partly or completely inhibited by protease inhibitors. Thus, some studies have shown that 60 seconds of chlorhexidine (CHX) application following acid etching can increase the stability of the resin-dentin bond.¹¹⁻¹³ A 2% CHX solution, such as is usually employed in the control of microorganisms of the dental plaque and saliva¹⁴, may also be used as a potent MMP inhibitor¹⁵ towards the preservation of the hybrid layer.^{11-13,16}

In spite of its potential advantages, CHX application following acid etching constitutes an additional clinical procedure rather than a desirable simplification of the technique.¹⁷ In addition, in view of the sensitivity of total acid etching to adhesive procedures, the actual role of collagen fibrils in adhesive-dentin bonding has been the object of some controversy.¹⁸⁻¹⁹

Some authors have discussed morphological changes in collagen fibrils associated with acid etching of the dentin surface,²⁰ suggesting that fibrils could be denatured by phosphoric acid.²¹⁻²²

The process was demonstrated in a study denaturing collagen fibrils by exposure to 35% phosphoric acid for 15 seconds.²³ Acid etching can also to increase the sensitivity of the dentin collagen to the hydrolytic action of trypsin, especially if the collagen has already been denatured.²⁴⁻²⁵ According to Eliades *et al.*,²⁶ approximately half the collagen fibrils in the dentin are denatured by acid etching.

From the clinical and functional point of view, the question of interest is not the time and concentration required for the acid to denature the dentin collagen, but the relationship between collagen denaturation and the mechanical properties of the adhesive process.

Protein denaturation is determined by a range of physicochemical factors, including temperature, pH and pressure.²⁷ The temperature of the dental substratum (especially the dentin) may increase to as much as 300°C during certain clinical procedures, such as drilling with high-speed dental burs with insufficiently irrigated and vertical gutta-percha condensation. High temperatures can cause the denaturation of the matrix of mineralized or partly demineralized dentin.²⁸⁻²⁹ Following acid etching of the dentin, intact demineralized collagen fibrils become more sensitive to thermal denaturation.³⁰ Collagen fibrils have also been shown to be denatured by immersion in water at temperatures above 43°C.³¹⁻³²

The main purpose of the present study was to determine whether CHX application prior to dental restoration provides greater immediate and long-term bond strength, assuming CHX preserves the hybrid layer by inhibiting endogenous MMP. Secondly, the study tested the effect of thermal collagen denaturation in water at 50°C on immediate and long-term bond strength through experiments with different adhesive protocols.

Materials and methods

The study was previously approved by the research ethics committee of the Federal University of Ceará under protocol #109/08.

The groups (CHX treatment, thermal denaturation and control) were compared statistically with regard to bond strength.

The complete sample consisted of 30 human caries-free third molars freshly extracted from subjects with surgical or orthodontic indication. All tooth donors signed a donation form. Tooth donors were at no time exposed to risk through the study.

After proper cleaning and removal of periodontal tissue residues, the teeth were preserved in 0.01% saturated aqueous thymol solution at 4°C for no more than six months. All study procedures, from sample preparation to experiments, were performed by the same researcher in order to minimize intra-operator variability.³⁴

Specimen preparation

To expose the dentin surface the occlusal enamel was completely removed by wet grinding. The specimens perpendicularly to the axis with a 180-grit silicon carbide paper disc (Figures 1A–B). During the procedure, the surface was observed under light microscopy at 30X magnification to make sure no enamel remained. Grinding was repeated when necessary until the surface of the dentin was level and even. The dentin was subsequently wet polished with a 600-grit silicon carbide paper disc for 60 seconds to standardize the smear layer.

All dentin surfaces were submitted to prophylaxis with a Robinson brush and aqueous pumice suspension followed by 37% phosphoric acid gel etching for 15 seconds and rinsing for 20 seconds with tap water. The specimens were randomly distributed in three groups (control, chlorhexidine and denaturation).

Thermal treatment

Following acid etching, each group of teeth (control, chlorhexidine and denaturation) was further submitted to a thermal treatment:

Group 1: immersion in water at 37°C for 10 minutes (control).

Group 2: immersion in water at 37°C for 10 minutes (chlorhexidine).

Group 3: immersion in water at 50°C for 10 minutes (denaturation).

Bonding procedures

Control and Denaturation group (conventional technique)

Following thermal collagen denaturation, excess dentin moisture was removed with absorbent paper. Single-bond (SB) adhesive (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) was applied to the entire surface according to the manufacturer's directions, followed by light curing for 20 seconds (Ultraluz, Dabi Atlante, Brazil, light intensity output $>400 \text{ mW/cm}^2$). To build a flat 6-mm high restoration, composite resin increments measuring 2mm (3M ESPE Z100, St. Paul, MN, USA) were packed and light-cured individually for 20 seconds (Figure 1C; Table 1)

Chlorhexidine group (experimental technique)

The experimental technique was similar to the conventional technique, with the following exceptions: Dentin moisture was removed with an air jet, followed by application of a 2% CHX (FGM, Joinville, SC, Brazil) solution to the entire dentin surface using a sterilized brush for 60 seconds. Excess CHX was removed with absorbent paper.

Microtensile bond test

Following bonding procedures, specimens were randomly distributed in two groups and stored in distilled water at 37°C for either 24 hours or 6 months in preparation for microtensile bond testing.

Subsequently, specimens were sectioned perpendicularly to the adhesive interface (Figure 1D) using a low-speed water-cooled double-sided diamond disc (Kerr, Orange, CA, USA) coupled to a serial section microtome (Isomet, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) while taking care not to separate the slices completely. The slices were then sectioned perpendicularly to the long axis to make sticks with a cross-sectional area of 1mm² (Figure 1E). Each stick consisted of resin, hybrid layer and dentin. Finally, the sticks were examined under a microscope at 40x magnification to screen for enamel residue in the hybrid layer. Specimens with residues were discarded.

Microtensile bond testing was performed with a Bencor Multi T (Danville Engineering, San Ramon, CA, USA) coupled to a universal testing machine (Instron 4411, Instron Corporation, Canton, MA, USA). Using a cyanoacrylate-based adhesive (Zapit, DVA, Yorba Linda, CA, USA), the specimens were fastened individually to the device with the adhesive interface positioned perpendicularly to the long axis of the tensile force. The tests were performed at a crosshead speed of 1.0mm/min.

Following failure, the two parts of the specimen were carefully removed from the device using a scalpel size 15. The area of fracture (cm²) was measured with a universal digital caliper (accuracy 0.01 mm) and the tensile force (kg) applied at the time of failure was registered. Final bond strength values were calculated and expressed in MPa.

Bond failure analysis

Bond failure was evaluated for all test specimens under light microscopy at 40x magnification (Leica Zoom 2000, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and classified as “adhesive”, “cohesive in dentin”, “cohesive in resin” or “mixed” (adhesive + cohesive).

Statistical analysis

Data were tested for normality and homogeneity of variance with the Kolmogorov-Smirnov test and Levene’s test, respectively. The influence of storage time on bond strength was analyzed for the control group, denaturation group and CHX treatment group using Snyder’s F test. Multiple comparisons were performed with the Tukey test. Subgroups were compared pairwise. Student’s *t* test was used for independent variables. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Table 2 shows the results of the microtensile bond test. After 24 hours of storage, the average bond strength in the CHX group (42.11 ± 7.07 MPa) differed significantly from that of the thermal denaturation group (48.57 ± 8.61 MPa) and the control group (51.20 ± 8.58 MPa) ($p < 0.05$). After six months of storage, bond strength had decreased significantly in all groups: the corresponding values were 35.30 ± 7.09 MPa, 35.40 ± 7.50 MPa and 37.24 ± 8.67 MPa ($p < 0.05$). Hence, the percentage loss of bond strength after 6 months was smaller in the CHX group (16.08%) than in the thermal denaturation group (28.58%) or the control group (27.27%).

Table 3 shows the results of the bond failure analysis. Across the groups, most failures were of the mixed type. Adhesive failures were relatively more frequent among aged specimens (6 months) of the control group and the thermal denaturation group. This type of failure was primarily associated with low bond strength.

Discussion

Knowledge of the properties of adhesive materials is important when planning dental restoration. Because adhesives are exposed to strong and complex mechanical forces, much research effort has gone into identifying parameters predicting durability and strength.¹

The microtensile bond test used in this study to measure resin-dentin bond strength has become increasingly popular over the past years as it provides data close to real-life tensile scenarios.³⁵ Other studies have also used this test to evaluate the bond strength.^{11,36-42}

In the present study, the use of CHX significantly affected bond strength at 24 hours compared to controls and thermal denaturation, contrasting with several other studies based on the same methodology.^{11,12,39-42}

After six months of storage, bond strength had decreased significantly in all groups, but the percentage loss in the CHX group (16.08%) was smaller compared to controls (27.27%) and thermal denaturation (28.58%), suggesting loss of bond strength may be partly prevented by treatment with CHX. Similar results were obtained in previous studies *in vitro*^{11,12,39-41} and *in vivo*.^{33,43}

CHX is a broad-spectrum, low-toxicity antibacterial agent used in the control of oral bacteria.⁴⁴ Some authors have therefore proposed using CHX for disinfection of cavities before restoration. However, it is still not clear whether CHX should be administered before or after acid etching.^{45,46}

Pashley *et al.*⁴⁷ demonstrated that, when applied to demineralized dentin before the application of adhesive, in addition to its antibacterial activity, CHX can help prevent degradation of the collagen fibrils of the hybrid layer.

Based on evidence from *in vitro* and *in vivo* studies published over the past decade, adhesive-dentin bond strength tends to decrease over time.^{4-7,11,37,48} The mechanism of this deterioration is not fully understood, but the process involves both dentin and resin and is negatively affected by the action of water (hydrolytic degradation) and dentin enzymes (enzymatic degradation).⁴³

Collagen degradation induced by endogenous enzymes appears to be the most important factor in the loss of resin-dentin bond strength over time.¹⁶ Pashley *et al.*⁴⁷ were the first to publish evidence of this process, showing that collagen matrix could be completely degraded by 250 days of exposure to artificial saliva *in vitro*. Conversely, dentin stored in a

cocktail of protease inhibitors or in pure mineral oil presented no morphological changes. This was also the first study to hypothesize matrix metalloproteinases as the cause of dentin collagen degradation. The process has been studied *in vitro* by other researchers.^{11,49,50}

In addition, Pashley *et al.*⁴⁷ discovered MMPs may be inhibited by synthetic inhibitors, leading to a search for MMP inhibitors capable of protecting the hybrid layer against degradation. Thus, even at very low concentrations (0.0001-0.02%), CHX has been shown to inhibit MMP-2, MMP-8 and MMP-9,¹⁵ all of which are found in human dentin.¹⁰

Some authors have speculated that, due to its extremely high acidity (pH 0.7), phosphoric acid might cause partial or complete MMP denaturation during dentin demineralization, thereby preventing these enzymes from degrading exposed collagen fibrils. Mazzoni *et al.*⁵¹ demonstrated that acid etching for 15 seconds can inactivate proteases in the dentin. However, the author also found that the use of conventional adhesive systems can reactivate endogenous MMPs previously inactivated by phosphoric acid etching.

Several studies *in vitro* and *in vivo* have confirmed that CHX does in fact prevent degradation of exposed collagen fibrils, preserving the hybrid layer and extending bond stability over time.^{11-13,16,33,39-43,47,52}

Although bond strength was smaller in the CHX group than in the control group or the thermal denaturation group at 24 hours, the loss of bond strength after 6 months of storage was significantly less extensive in this group. Our results show that CHX can improve resin-dentin bond stability over time when applied to dentin surfaces demineralized by phosphoric acid.

In the control group adhesive failures were more frequent at 6 months than at 24 hours. This was not observed in the CHX group, suggesting the collagen matrix in the hybrid layer was better preserved.¹¹

Nevertheless, several authors⁵³⁻⁵⁷ have argued collagen fibrils may not play such an important role in the micromechanical bonding of dentin and adhesive, suggesting fibrils be removed rather than preserved. This could however reduce sensitivity to the adhesive. Some have suggested applying sodium hypochlorite after phosphoric acid etching in order to remove the organic compounds of the dentin, transforming it into a substratum more akin to enamel. Sodium hypochlorite exerts a non-specific proteolytic effect and is an efficient remover of organic compounds. It may be used to deproteinize dentin, eliminating exposed

collagen fibrils and increasing surface porosity.⁵⁴ Over certain time periods, such restorations may display greater bond strength than conventional restorations.^{53-55,57}

The relationship between deproteinization or collagen denaturation and the mechanical properties of the adhesive process is complex and requires further investigation.

Phosphoric acid etching can denature both MMPs and dentin collagen fibrils. Some authors believe collagen fibrils may be denatured after acid etching.^{20-24,26}

In our study, at both 24 hours and 6 months, bond strength was similar for the thermal denaturation group and the control group. This diverges from the conclusions of Spencer *et al.*²³ and Okamoto *et al.*²⁴, according to whom denatured collagen tends to reduce the strength and durability of the resin-dentin bond.

Regardless of the effect of phosphoric acid etching on the dentin collagen, denaturation did not appear to be a significant factor in bond strength since results were statistically similar for the thermal denaturation group and the control group.

Conclusion

The hybrid layer of caries-free human molars restored *in vitro* was extensively degraded over a period of 6 months. However, treatment with chlorhexidine reduced loss of bond strength in relation to controls. Further studies are required to define the ideal CHX concentration and method of application.

Thermal denaturation of collagen fibrils did not affect bond strength, which was statistically similar to that of the control group. The relationship between collagen denaturation and the mechanical properties of the adhesive process is complex and in need of further investigation.

Deproteinization and collagen denaturation do not appear to impact bond strength negatively and may not play a very important role in the micromechanical bonding of dentin and adhesive.

Acknowledgments

This project has received financial support from CAPES. The authors thank Prof. Luis Flávio Gaspar Herculano (LACAM – Laboratory of Materials Characterization) for mechanical assistance. This paper was based on a thesis submitted by first author to the Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing of the Federal University of Ceará, in partial fulfillment of the requirements for an MS degree in Dentistry.

References

1. Silveira RR. Avaliação da resistência à microtração de reparos em resina composta, utilizando-se diferentes tratamentos de superfície. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
2. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal of Biomedical Materials Research* 1982; **16**(3):265-73.
3. Burrow MF, Tagami J, Negishi T, Nikaido T, Hosoda H. Early tensile bond strengths of several enamel and dentin bonding systems. *Journal of Dental Research* 1994; **73**(2):522-8.
4. 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.
5. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;**63**(3):306-11.
6. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, et al. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2003; **15**;66(1):287-98.
7. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE, et al. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Operative Dentistry* 2004; **29**(6):705-12.
8. Wang Y, Spencer P. Continuing etching of an all-in-one adhesive in wet dentin tubules. *Journal of Dental Research* 2005; **84**(4):350-4.
9. Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *Journal of Dental Research* 2006; **85**(1):11-4.

10. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *Journal of Dental Research* 2002; **81**(9):603-7.
11. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *Journal of Dental Research* 2007; **86**(1):90-4.
12. Breschi L, Mazzonic A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year *in vitro* study. *Dental Materials* 2009; **26**:320-5.
13. 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. *Operative dentistry* 2009; **34**(4):379-83.
14. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *Journal of American Dental Association*, 1986; **112**(6):863-9.
15. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999; **6**(3):437-9.
16. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *Journal of Dental Research* 2007 ;**86**(6):529-33.
17. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become to hydrophilic? *Journal of the canadian dental association* 2003;**69**(11):726-31.
18. Vargas MA, Cobbs DS, Armstrong SR. Resin-dentin shear Bond strenght and interfacial ultrastructure with and without a hybrid layer. *Operative Dentistry* 1997; **22**(4):159-166.
19. Maior JRS, Figueira MAS, Netto ABAB, Souza FB, Silva CHV, Tredwin CJ. The influence of dentin collagen fibrils on the marginal sealing of adhesive restorations. *Operative Dentistry* 2007; **32**(3):261-65.
20. Eliades G, Palaghias G, Vougiouklalis G. Effect of acidic conditioners on dentin morphology, molecular composition and collagen conformation in situ. *Dental Materials* 1997; **13**(1):24-33.
21. El Feninat F, Ellis TH, Sacher E, Stangel I. Moisture-dependent renaturation of collagen in phosphoric acid etched human dentin. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998; **42**(4):549-53.
22. Okamoto Y. Influence of composite resin on organic matrix in dentin. *Quintessence*. 1985; **4**:1097.

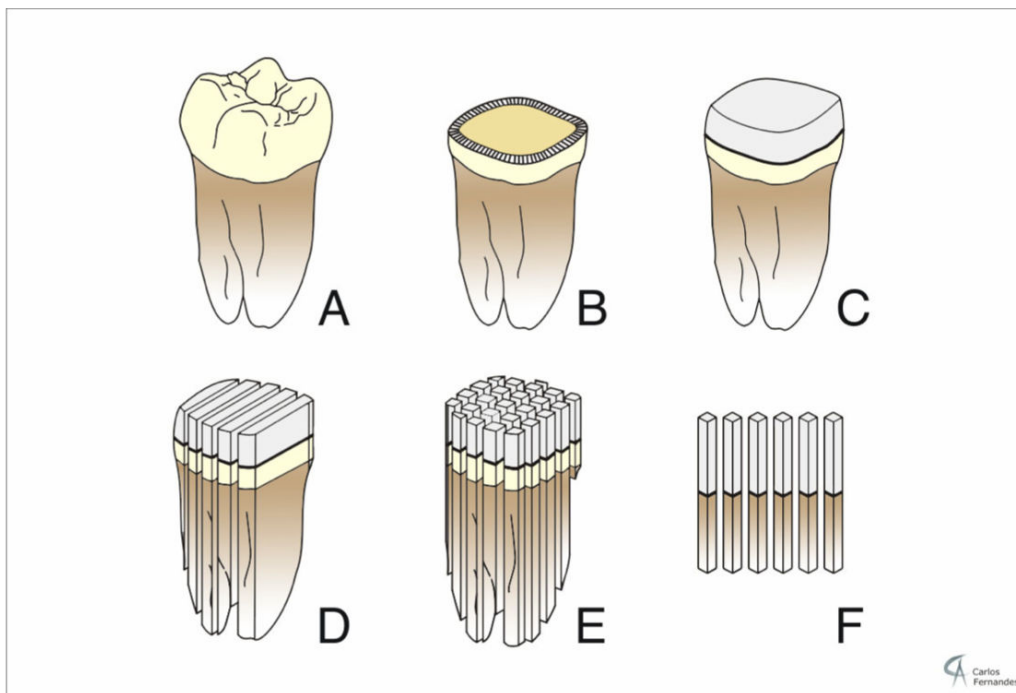
23. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Swafford JR. Molecular structure of acid-etched dentin smear layers--in situ study. *Journal of Dental Research* 2001; **80**:1802-7.
24. Okamoto Y, Heeley JD, Dogon IL, Shintani H. Effects of phosphoric acid and tannic acid on dentine collagen. *Journal of Oral Rehabilitation* 1991; **18**(6):507-12.
25. Agee K, Zhang Y, Pashley DH. Effects of acids and additives on the susceptibility of human dentine to denaturation. *Journal of Oral Rehabilitation* 2000; **27**(2):136-41.
26. Eliades G, Palaghias G, Vougiouklakis G. Effect of dentin primers on the morphology, molecular composition and collagen conformation of acid-demineralized dentin in situ. *Dental Materials* 1999; **15**:310-7.
27. Huang P, Dong A. Thermal, chemical and chemothermal denaturation of yeast enolase. *Spectroscopy* 2003; **17**:453-467.
28. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. Stabilization of gelatin films by cross-linking with genipin. *Biomaterials* 2002; **23**:4827-32.
29. Armstrong SR, Jessop JL, Winn E, Tay FR, Pashley DH. Effects of polar solvents and adhesive resin on the denaturation temperatures of demineralised dentine matrices. *Journal of Dentistry*, 2008; **36**(1):8-14.
30. Armstrong SR, Jessop JL, Winn E, Tay FR, Pashley DH. Denaturation temperatures of dentin matrices. I. Effect of demineralization and dehydration. *Journal of Endodontics*, 2006; **32**(7):638-41.
31. Friess W, Lee G, Groves MJ. Insoluble collagen matrices for prolonged delivery of proteins. *Pharmaceutical Development and Technology* 1996; **1**(2):185-93.
32. Miles CA, Avery NC, Rodin VV, Bailey AJ. The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. *Journal of Molecular Biology* 2005; **346**(2):551-6.
33. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *Journal of Dental Research* 2005; **84**(8):741-6.
34. Shono Y, Ogawa T, Terashita M, Carvalho RM, Pashley EL, Pashley DH. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. *Journal of Dental Research* 1999; **78**(2):699-705.
35. Schreiner RF, Chappell RP, Glaros AG, Eick JD. Microtensile testing of dentin adhesives. *Dental Materials* 1998; **14**: 194-201.
36. De Munck J, Van Meerbeek B, *et al.* Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *Journal of Dental Research*, 2003; **82**(2):136-40.
37. Donnez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural correlates of in vivo/ in vitro bond degradation in self-etch adhesives. *Journal of Dental Research* 2005; **84**(4):355-359.

38. Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *Journal of Dentistry*, 2008; **36**(12):1068-73.
39. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carilho M, Cadenaro M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: A 12-month in vitro study. *Journal of Adhesive Dentistry* 2009; **11**:191-198.
40. 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. *Journal of Dentistry* 2009 ;**37**(2):108-14.
41. Komori PCP, Pashley DH, Tjoderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF, et al. Effect of 2% Chlorhexidine Digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Operative Dentistry* 2009; **34**(2):157-165.
42. Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserve the longevity of resin-dentin bonds. *Operative Dentistry* 2009;**34**(4):481-490.
43. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin–dentin bonds. *European Journal of Oral Sciences* 2010; **118**:411–416.
44. Johnson BT. Uses of chlorhexidine in dentistry. *General Dentistry* 1995; **43**(2):126-140.
45. De Castro FL, de Andrade MF, Duarte Júnior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *Journal of Adhesive Dentistry* 2003; **5**(2):129-38.
46. 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**(2):183-8.
47. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal of Dental Research*. 2004; **83**(3):216-21.
48. Koshiro K, Inoue S, Tanaka T, Koase K, Fujita M, Hashimoto M, et al. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch vs. a total-etch adhesive system. *European Journal of Oral Sciences*. 2004; **112**(4):368-75.
49. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *American Journal of Dentistry* 2005; **18**(6):315-9.
50. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *European Journal of Oral Sciences* 2006; **114**(2):160-6.

51. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006; **27**: 4470–4476
52. 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**(2):107-11.
53. Wakabayashi Y, Kondou Y, Suzuki K, Yatani H, Yamashita A. Effect of dissolution of collagen on adhesion to dentin. *The International journal of prosthodontics*. 1994; **7**(4):302-6.
54. Prati C, Chersoni S, Pashley DH. Effect of removal of surface collagen fibrils on resin–dentin bonding. *Dental Materials* 1999; **15**:323–331
55. De Castro AK, Hara AT, Pimenta LA. Influence of collagen removal on shear bond strength of one-bottle adhesive systems in dentin. *Journal of Adhesive Dentistry*, 2000; **2**(4):271-7.
56. Shinohara MS, Bedran-de-Castro AK, Amaral CM, Pimenta LA. The effect of sodium hypochlorite on microleakage of composite resin restorations using three adhesive systems. *Journal of Adhesive Dentistry*, 2004; **6**(2):123-7.
57. Monticelli F, Toledano M, Silva AS, Osorio E, Osorio R. Sealing effectiveness of etch-and-rinse vs self-etching adhesives after water aging: influence of acid etching and NaOCl dentin pretreatment. *Journal of Adhesive Dentistry*, 2008; **10**(3):183-8.

Table 1: Adhesive and resin composition and instructions for use.

Adhesive	Composition	Instruction for use
Adper Single Bond (3M-ESPE, USA)	HEMA, bis-GMA, DMA's methacrylate functional copolymer of polyacrylic and polyitaconic acids, water, ethanol, nanofiller, photo-initiator	<ol style="list-style-type: none"> 1. Apply two consecutive coats of adhesive for 15 seconds with gently agitation using a fully saturated applicator. 2. Gently air thin for five seconds to evaporate the solvent. 3. Light cure for 20 seconds.
Composite Resin	Composition	Instruction for use
Z100 (3M ESPE)	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, zircônia/silica filler, aluminium oxide	<ol style="list-style-type: none"> 1. Place 3M Filtek Z100 restorative in increments less than 2 mm. 2. Light cure each increment for 40 seconds

Figure 1: Preparation of resin-dentin beams for microtensile bond testing.

- A: Non-carious third molars
 B: Occlusal enamel removed and exposure of flat dentin surface
 C: Resin composite core build-up
 D: Mesio-distal sectioning
 E: Buccal-lingual sectioning
 F: 1,0mm² beams

Table 2 – Microtensile bond strength values

	Bond Strenght	
	Imediate MPa ± SD	6 months MPa ± SD
Control	51,20 ± 8,58 (43) ^a	37,24 ± 8,67 (49) ^c
Chlorhexidine	42,11 ± 7,07 (31) ^b	35,30 ± 7,09 (40) ^c
Denaturation	48,57 ± 8,61 (37) ^a	35,40 ± 7,50 (45) ^c

Bond strength values are means ± standard deviations (n = beans). Different superscripts indicate statistically significant differences (p<0,05)

Table 3 – Failure mode

	Failure mode (%) (n = beans)							
	Imediate				6 Months			
	A	M	CR	CD	A	M	CR	CD
Control	13,95% (6)	74,41% (32)	6,97% (3)	4,65% (2)	36,73% (18)	53,06% (26)	8,16% (4)	2,04% (1)
Chlorhexidine	9,67% (3)	80,64% (25)	6,45% (2)	3,22% (1)	10% (4)	80% (32)	7,5% (3)	2,5% (1)
Denaturation	13,51% (5)	75,67% (28)	8,10% (3)	2,70% (1)	31,11% (14)	62,22% (28)	6,66% (3)	0% (0)

A, Adhesive; M, mixed failure; CD, cohesive failure in dentin; CC, cohesive failure in resin composite.

4 CONCLUSÃO GERAL

Da avaliação dos resultados obtidos nesta dissertação, pode-se concluir que:

A degradação da camada híbrida foi extensa no período de 6 meses. Esta degradação foi diminuída, mas não eliminada, com o uso da CHX. Portanto, seriam importantes estudos adicionais no intuito de esclarecer e definir a concentração e qual a forma ideal de aplicação da CHX.

A desnaturação térmica das fibras de colágeno não influenciou a resistência adesiva, apresentando resultados similares ao grupo controle, entretanto a relação entre a desnaturação do colágeno e as mudanças nas propriedades mecânicas das restaurações adesivas ainda não está bem estabelecida.

A desproteção ou a desnaturação das fibras de colágeno podem não ter um impacto negativo sobre a resistência das restaurações adesivas, levando-nos a pensar se as fibras de colágeno são realmente importantes na união micromecânica entre a dentina e o material adesivo.

REFERÊNCIAS

- AGEE, K.; ZHANG, Y.; PASHLEY, D. H. Effects of acids and additives on the susceptibility of human dentine to denaturation. **J. Oral Rehabil.**, v. 27, n. 2, p. 136-141, 2000.
- ARMSTRONG, S. R.; JESSOP, J. L.; WINN, E.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Denaturation temperatures of dentin matrices. I. Effect of demineralization and dehydration. **J. Endod.**, v. 32, n. 7, p. 638-641, 2006.
- ARMSTRONG, S. R.; JESSOP, J. L.; WINN, E.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Effects of polar solvents and adhesive resin on the denaturation temperatures of demineralised dentine matrices. **J. Dent.**, v. 36, n. 1, p. 8-14, 2008.
- ARMSTRONG, S. R.; VARGAS, M. A.; CHUNG, I.; PASHLEY, D. H.; CAMPBELL, J. A.; LAFFOON, J. E.; QIAN, F. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. **Oper. Dent.**, v. 29, n. 6, p. 705-712, 2004.
- AVERY, J. K. **Dentina**. 10. ed. São Paulo: Artes médicas, 1989. (Histologia e Embriologia Oral).
- BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. Stabilization of gelatin films by cross-linking with genipin. **Biomaterials**, v. 23, p. 4827-4832, 2002.
- BRACKETT, M. G.; TAY, F. R.; BRACKETT, W. W.; DIB, A.; DIPP, F. A.; MAI, S.; PASHLEY, D. H. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. **Oper. Dent.**, v. 34, n. 4, p. 379-383, 2009.
- BRACKETT, W. W.; TAY, F. R.; BRACKETT, M. G.; DIB, A.; SWORD, R. J.; PASHLEY, D. H. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. **Oper. Dent.**, v. 32, n. 2, p. 107-111, 2007.
- BRESCHI, L.; CAMMELLI, F.; VISINTINI, E.; MAZZONI, A.; VITA, F.; CARRILHO, M.; CADENARO, M.; FOULGER, S.; MAZZOTI, G.; TAY, F. R.; 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.**, v. 11, p. 191-198, 2009.
- BURROW, M. F.; TAGAMI, J.; NEGISHI, T.; NIKAIDO, T.; HOSODA, H. Early tensile bond strengths of several enamel and dentin bonding systems. **J. Dent. Res.**, v. 73, n. 2, p. 522-528, 1994.
- CAMPOS, E. A.; CORRER, G. M.; LEONARDI, D. P.; BARATO-FILHO, F.; GONZAGA, C. C.; ZIELAK, J. C. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. **J. Dent.**, v. 37, n. 2, p. 108-114, 2009.
- CARRILHO, M. R.; CARVALHO, R. M.; DE GOES, M. F.; DI HIPÓLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; TJÄDERHANE, L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 1, p. 90-94, 2007a.

CARRILHO, M. R.; CARVALHO, R. M.; TAY, F. R.; YIU, C.; PASHLEY, D. H. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. **Am. J. Dent.**, v. 18, n. 6, p. 315-319, 2005.

CARRILHO, M. R.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M. F.; CARVALHO, R. M.; TJÄDERHANE, L.; REIS, A. F.; HEBLING, J.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 6, p. 529-533, 2007b.

CARVALHO, R. M. **As relações entre alterações dimensionais, permeabilidade e propriedades mecânicas da matriz de dentina desmineralizada**: estudo sob a óptica da teoria dos parâmetros de solubilidade. 2002. 92 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2002.

CARVALHO, R. M.; CARRILHO, M. R. O.; PEREIRA, L. C. G.; GARCIA, F. C. P.; MARQUEZINI JUNIOR, L.; SILVA, S. M. A. E.; KUSSMAUL, A. P. M. Sistemas adesivos: fundamentos para aplicação clínica. **Biodonto**, v. 2, 2004.

DE CASTRO, A. K.; HARA, A. T.; PIMENTA, L. A. Influence of collagen removal on shear bond strength of one-bottle adhesive systems in dentin. **J. Adhes. Dent.**, v. 2, n. 4, p. 271-277, 2000.

DE CASTRO, F. L.; De ANDRADE, M. F.; DUARTE JÚNIOR, S. L.; VAZ, L. G.; AHID, F. J. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. **J. Adhes. Dent.**, v. 5, n. 2, p. 129-138, 2003.

DE MUNCK, J.; Van MEERBEEK, B.; YOSHIDA, Y.; INOUE, S.; VARGAS, M.; SUZUKI, K.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 2, p. 136-140, 2003.

DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; PEUMANS, M.; POITEVIN, A.; LAMBRECHTS, P.; BRAEM, M.; VAN MEERBEEK, B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 2, p. 118-132, 2005.

DONNEZ, N.; BELLI, S.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Ultrastructural correlates of in vivo/ in vitro bond degradation in self-etch adhesives. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 4, p. 355-359, 2005.

EI FENINAT, F.; ELLIS, T. H.; SACHER, E.; STANGEL, I. Moisture-dependent renaturation of collagen in phosphoric acid etched human dentin. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 42, n. 4, p. 549-553, 1998.

ELIADES, G. Clinical relevance of the formulation and testing of dentine bonding systems. **J. Dent.**, v. 22, n. 2, p. 73-81, 1994.

ELIADES, G.; PALAGHIAS, G.; VOUGIOUKLAKIS, G. Effect of acidic conditioners on dentin morphology, molecular composition and collagen conformation in situ. **Dent. Mater.**, v. 13, n. 1, p. 24-33, 1997.

ELIADES, G.; PALAGHIAS, G.; VOUGIOUKLALIS, G. Effect of dentin primers on the morphology, molecular composition and collagen conformation of acid-demineralized dentin in situ. **Dent. Mater.**, v. 15, p. 310-317, 1999.

ERHARDT, M. C.; OSORIO, R.; TOLEDANO, M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. **J. Dent.**, v. 36, n. 12, p. 1068-1073, 2008.

FARDAL, O.; TURNBULL, R. S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 112, n. 6, p. 863-869, 1986.

FRIESS, W.; LEE, G.; GROVES, M. J. Insoluble collagen matrices for prolonged delivery of proteins. **Pharm. Dev. Technol.**, v. 1, n. 2, p. 185-193, 1996.

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.**, v. 6, n. 3, p. 437-439, 1999.

HANDELMAN, S. L.; SHEY, Z. Michael Buonocore and the Eastman Dental Center: a historic perspective on sealants. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 1, p. 529-534, 1996.

HASHIMOTO, M.; OHNO, H.; SANO, H.; TAY, F. R.; KAGA, M.; KUDOU, Y.; OGUCHI, H.; ARAKI, Y.; KUBOTA, M. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 63, n. 3, p. 306-311, 2002.

HASHIMOTO, M.; TAY, F. R.; 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. Mat. Res. Part B: Appl. Biomater.**, v. 66, n. 1, p. 287-298, 2003.

HEBLING, J.; PASHLEY, D. H.; TJÄDERHANE, L.; TAY, F. R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 8, p. 741-746, 2005.

HUANG, P.; DONG, A. Thermal, chemical and chemothermal denaturation of yeast enolase. **Spectroscopy**, v. 17, p. 453-467, 2003.

JOHNSON, B. T. Uses of chlorhexidine in dentistry. **Gen. Dent.**, v. 43, n. 2, p. 126-140, 1995.

KOMORI, P. C. P.; PASHLEY, D. H.; TJÄDERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; DE GOES, M. F.; WANG, L.; CARRILHO, M. R. Effect of 2% Chlorhexidine Digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. **Oper. Dent.**, v. 34, n. 2, p. 157-165, 2009.

KOSHIRO, K.; INOUE, S.; TANAKA, T.; KOASE, K.; FUJITA, M.; HASHIMOTO, M.; SANO, H. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch vs. a total-etch adhesive system. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 112, n. 4, p. 368-375, 2004.

LI, H.; BURROW, M. F.; TYAS, M. J. Nanoleakage patterns of four dentin bonding systems. **Dent. Mater.**, v. 16, n. 1, p. 48-56, 2000.

LUESCHER, M.; RUEGG, M.; SCHINDLER, P. Effect of hydration upon the thermal stability of tropocollagen and its dependence on the presence of neutral salts. **Biopolymers**, v. 13, n. 12, p. 2489-2503, 1974.

MAIOR, J. R. S.; FIGUEIRA, M. A. S.; NETTO, A. B. A. B.; SOUZA, F. B.; SILVA, C. H. V.; TREDWIN, C. J. The influence of dentin collagen fibrils on the marginal sealing of adhesive restorations. **Oper. Dent.**, v. 32, n. 3, p. 261-265, 2007.

MAZZONI, A.; PASHLEY, D. H.; NISHITANI, Y.; BRESCHI, L.; MANNELLO, F.; TJÄDERHANE, L.; TOLEDANO, M.; PASHLEY, E. L.; TAY, F. R. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. **Biomaterials**, v. 27, p. 4470-4476, 2006.

MILES, C. A.; AVERY, N. C.; RODIN, V. V.; BAILEY, A. J. The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. **J. Mol. Biol.**, v. 346, n. 2, p. 551-556, 2005.

MONTICELLI, F.; TOLEDANO, M.; SILVA, A. S.; OSORIO, E.; OSORIO, R. Sealing effectiveness of etch-and-rinse vs self-etching adhesives after water aging: influence of acid etching and NaOCl dentin pretreatment. **J. Adhes. Dent.**, v. 10, n. 3, p. 183-188, 2008.

NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 16, n. 3, p. 265-273, 1982.

NAKABAYASHI, N.; PASHLEY, D. **Condicionamento ácido e hibridização dos substratos**. São Paulo: Quintessence, 2000a. (Hibridização dos Tecidos Duros Dentais).

NAKABAYASHI, N.; PASHLEY, D. **Evolução da adesão entre resina e dentina**. São Paulo: Quintessence, 2000b. (Hibridização dos Tecidos Dentais Duros).

NISHITANI, Y.; YOSHIYAMA, M.; WADGAONKAR, B.; BRESCHI, L.; MANNELLO, F.; MAZZONI, A.; CARVALHO, R. M.; TJÄDERHANE, L.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 114, n. 2, p. 160-166, 2006.

OKAMOTO, Y. Influence of composite resin on organic matrix in dentin. **Quintessence**, v. 4, p. 1097, 1985.

OKAMOTO, Y.; HEELEY, J. D.; DOGON, I. L.; SHINTANI, H. Effects of phosphoric acid and tannic acid on dentine collagen. **J. Oral Rehabil.**, v. 18, n. 6, p. 507-512, 1991.

PASHLEY, D. H.; SANO, H.; CIUCCHI, B.; YOSHIYAMA, M.; CARVALHO, R. M. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. **Dent. Mater.**, v. 11, n. 2, p. 117-125, 1995.

PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R. M.; ITO, S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J. Dent. Res.**, v. 83, n. 3, p. 216-221, 2004.

PERDIGÃO, J.; RITTER, A. V. **Adesão aos Tecidos Dentários**. São Paulo: Quintessence, 2001. (Odontologia Restauradora: Fundamentos e Possibilidades).

PRATI, C.; CHERSONI, S.; PASHLEY, D. H. Effect of removal of surface collagen fibrils on resin-dentin bonding. **Dent. Mat.**, v. 15, p. 323-331, 1999.

RICCI, H. A.; SANABE, M. E.; DE SOUZA COSTA, C. A.; PASHLEY, D. H.; HEBLING, J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 118, p. 411-416, 2010.

ROCHDI, A.; FOUCAT, L.; RENO, J. P. Effect of thermal denaturation on water-collagen interactions: NMR relaxation and differential scanning calorimetry analysis. **Biopolymers**, v. 50, n. 7, p. 690-696, 1999.

SANO, H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 1, p. 11-14, 2006.

SANO, H.; YOSHIKAWA, T.; PEREIRA, P. N.; KANEMURA, N.; MORIGAMI, M.; TAGAMI, J.; PASHLEY, D. H. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 4, p. 906-911, 1999.

SCHREINER, R. F.; CHAPPELL, R. P.; GLAROS, A. G.; EICK, J. D. Microtensile testing of dentin adhesives. **Dent. Mat.**, v. 14, p. 194-201, 1998.

SHINOHARA, M. S.; BEDRAN-DE-CASTRO, A. K.; AMARAL, C. M.; PIMENTA, L. A. The effect of sodium hypochlorite on microleakage of composite resin restorations using three adhesive systems. **J. Adhes. Dent.**, v. 6, n. 2, p. 123-127, 2004.

SHONO, Y.; OGAWA, T.; TERASHITA, M.; CARVALHO, R. M.; PASHLEY, E. L.; PASHLEY, D. H. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 2, p. 699-705, 1999.

SILVEIRA, R. R. **Avaliação da resistência à microtração de reparos em resina composta, utilizando-se diferentes tratamentos de superfície**. 2003. 122 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.

SOARES, C. J.; PEREIRA, C. A.; PEREIRA, J. C.; SANTANA, F. R.; DO PRADO, C. J. Effect of chlorhexidine application on microtensile bond strength to dentin. **Oper. Dent.**, v. 33, n. 2, p. 183-188, 2008.

SPENCER, P.; WANG, Y.; WALKER, M. P.; SWAFFORD, J. R. Molecular structure of acid-etched dentin smear layers--in situ study. **J. Dent. Res.**, v. 80, n. 9, p. 1802-1807, 2001.

STANISLAWCZUK, R.; AMARAL, R. C.; ZANDER-GRANDE, C.; GAGLER, D.; REIS, A.; LOGUERCIO, A. D. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserve the longevity of resin-dentin bonds. **Oper. Dent.**, v. 34, n. 4, p. 481-490, 2009.

SULKALA, M.; LARMAS, M.; SORSA, T.; SALO, T.; TJÄDERHANE, L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. **J. Dent. Res.**, v. 81, n. 9, p. 603-607, 2002.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Have dentin adhesives become to hydrophilic? **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 69, n. 11, p. 726-731, 2003.

VAN MEERBEEK, B.; PERDIGAO, J.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. The clinical performance of adhesives. **J. Dent.**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 1998.

VARGAS, M. A.; COBBS, D. S.; ARMSTRONG, S. R. Resin-dentin shear Bond strenght and interfacial ultrastructure with and without a hybrid layer. **Oper. Dent.**, v. 22, n. 4, p. 159-166, 1997.

WAKABAYASHI, Y.; KONDOU, Y.; SUZUKI, K.; YATANI, H.; YAMASHITA, A. Effect of dissolution of collagen on adhesion to dentin. **Int. J. Prosthodont.**, v. 7, n. 4, p. 302-306, 1994.

WANG, Y.; SPENCER, P. Continuing etching of an all-in-one adhesive in wet dentin tubules. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 4, p. 350-354, 2005.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de Doação de Dentes.**TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES**

Eu, _____, CRO _____, estou doando _____ dentes terceiros molares livres de cárie, extraídos no meu consultório localizado _____ a _____ (rua, cidade) por necessidades clínicas, alheias a essa pesquisa e sob o consentimento do paciente, para a pesquisa intitulada “Avaliação *in vitro* do Efeito da Desnaturação Térmica do Colágeno e do Tratamento com Clorexidina da Dentina na Resistência Adesiva”, que será realizada na Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem pelos pesquisadores: CD Marília Mota Silva (Mestranda em Odontologia) e Prof. Carlos Augusto de Oliveira Fernandes (Orientador).

Fortaleza, _____ de 2008.

Assinatura do doador

Assinatura da testemunha

ANEXO A - Aprovação junto ao Comitê de Ética e Pesquisa

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 395/08

Fortaleza, 20 de junho de 2008

Protocolo COMEPE n° 109/ 08

Pesquisador responsável: Marília Mota Silva

Dept°./Serviço: Departamento de Odontologia/ UFC

Título do Projeto: "Avaliação in vitro do efeito da desnaturação térmica do colágeno e do tratamento com clorexidina na resistência adesiva"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n° 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 19 de junho de 2008.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC