**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

FABIANA ALMEIDA CURYLOFO ZOTTI

**REMOÇÃO SELETIVA DA LESÃO DE CÁRIE COM LASER DE
ER:YAG E BIOMODIFICAÇÃO DA DENTINA COM QUITOSANA**

Ribeirão Preto

2017

FABIANA ALMEIDA CURYLOFO ZOTTI

**REMOÇÃO SELETIVA DE LESÃO DE CÁRIE COM LASER DE ER:YAG E
BIOMODIFICAÇÃO DA DENTINA COM QUITOSANA**

*Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Doutora em Ciências, no Programa: Odontologia
Restauradora, Área de concentração: Odontologia
Restauradora – Dentística*

Orientadora: Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona

Versão corrigida

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que seja citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Curylofo-Zotti, FA

Remoção seletiva da lesão de cárie com laser de Er:YAG e biomodificação com quitosana. Ribeirão Preto, 2017.
95 p.: il.; 30 cm

Tese Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora. Área de concentração: Dentística - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.

Orientadora: Corona, Silmara Aparecida Milori.

1. Dentina cariada. 2. Interface adesiva. 3. Microtração. 4. Hidroxiprolina. 5. Microdureza.

Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Zotti, Fabiana Almeida Curylofo

Título: Remoção seletiva de lesão de cárie com laser de Er:YAG e biomodificação da dentina com quitosana

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

FABIANA ALMEIDA CURYLOFO ZOTTI

Nascimento 17 de Outubro de 1988. Ribeirão Preto-SP

Filiação Nice Seabra de Almeida Curylofo
José Paulo Curylofo

2008-2012 Curso de Graduação
Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP)

2012-2014 Curso de aperfeiçoamento em Dentística Integrada Estética
Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia
(FAEPO)

2012-2014 Curso de pós-graduação (Mestrado) em Odontologia
Área de concentração: Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr / UNESP)

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Pesquisa em Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com bolsa de doutorado concedida no âmbito do CONVÊNIO FAPESP/CAPES processo nº 2014/23654-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedicatória

À **Deus**, por estar presente em todos os momentos da vida, por guiar todos os meus passos e iluminar meu caminho para que pudesse chegar até aqui.

Aos meus amados pais **Nice** e **José Paulo**, obrigada pelo apoio incondicional, pela torcida em todos os momentos, por acreditarem em mim, por me ensinarem tudo que sei. Vocês são meus maiores exemplos e saber que tenho vocês por perto me torna mais forte para prosseguir. Amo vocês.

A minha melhor e maior companheira nessa vida, **Patrícia**, obrigada pelo incentivo e pelo apoio incondicional sempre. Eu nada seria sem sua amizade e carinho. Amo você minha irmã.

Ao meu querido esposo, **Vicente**, pelo companheirismo, incentivo, carinho e paciência. Obrigada por fazer dos meus sonhos os seus e por trilhar os caminhos da vida sempre ao meu lado. Eu amo você.

Agradecimento
especial

À minha querida professora **Silmara**, obrigada pelo incentivo e por todas as oportunidades que me proporcionou ao longo destes anos. Tenho em você um verdadeiro exemplo de dedicação, honestidade e perseverança. O convívio com você tornou meus dias mais leves e ter sua alegria, carinho, amizade e confiança é motivo de grande felicidade para mim. Obrigada ainda, por olhar além das minhas limitações e enxergar o que eu poderia ser.

“Professores ideais são aqueles que se transformam em pontes e que convidam os alunos a cruzá-la, depois de ter facilitado sua passagem, com alegria, os incentivam a criar pontes a partir de suas próprias atitudes.”

(Adaptado de Nikos Kazantzakis)

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, representada pelo Digníssimo Direto Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva e pelo vice-diretor Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.

À Coordenação Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, na pessoa da Prof. Dr. Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto.

Ao Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, na pessoa do Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva.

Aos Professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

A Profa. Dra. **Aline Evangelista Souza Gabriel**, meu agradecimento especial não apenas pela colaboração neste trabalho, mas por todos os ensinamentos transmitidos desde a graduação até hoje. Obrigada pelo carinho e incentivo de sempre.

À Profa. Dra. **Cristina Borsato**, pelo carinho, amizade e pela agradável convivência ao longo destes anos, e também por contagiar a todos que estão a sua volta com alegria.

À Profa. Dra. **Valéria Oliveira Pagnano de Souza** pelo carinho e amizade.

À Profa Dra. **Josemeri Hebling** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr UNESP pela disponibilidade e colaboração neste trabalho.

À **Débora Scheffel** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr UNESP pela disponibilidade e todo auxílio durante a realização das análises de perda de massa seca e liberação de hidroxiprolina.

À minha amiga, **Miriane Zucoloto** pela valiosa colaboração com parte da análise estatística realizada neste trabalho.

Aos queridos amigos que a FORP me deu **Bruno Matos, Flávia Rodrigues, Francine Lorencetti, Gabriela Solano, Gabriela Sturaro, Isabela Ziotti, Isadora Soares, Mirian Saavedra e Reinaldo Dias Neto** pelo companheirismo, apoio e amizade durante todo curso de Pós-Graduação.

A todos os colegas de Pós-Graduação, pela agradável convivência e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao **Carlos**, secretário do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por ser sempre tão prestativo e atencioso.

À **Ana Paula Macedo**, técnica do Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade imediata e valioso auxílio com parte da análise estatística realizada neste trabalho.

Aos funcionários **Patrícia Marchi, Juliana Faraoni e Reginaldo Santana e Débora Guedes** do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela atenção e disponibilidade de sempre.

A todos os funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela atenção e disposição.

Aos funcionários da Secção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio constante e dedicação aos alunos.

Ao **José Augusto**, técnico do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio durante a realização das análises de Espectroscopia Eletrônica de Análise Química E Microscopia Eletrônica de Varredura.

À **FAPESP/CAPES** pela concessão da Bolsa de Doutorado, concedida no âmbito do CONVÊNIO FAPESP/CAPES processo nº 2014/23654-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que me permitiu maior dedicação ao curso de Pós-Graduação, e pela concessão dos auxílios pesquisa processos nº 2011/00272-5 e 2014/07942-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que permitiram a aquisição do Laser Fotona e da turbina de baixa rotação utilizados neste estudo.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

RESUMO

Curylofo-Zotti, F.A. **Remoção seletiva de lesão de cárie com laser de Er:YAG e biomodificação da dentina com quitosana**. 2017. 95f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da remoção seletiva da lesão de cárie utilizando laser de Er:YAG, seguida da biomodificação da dentina com quitosana. Os objetivos específicos foram: 1) Avaliar os elementos químicos e a morfologia da superfície dentinária, bem como, a microdureza da subsuperfície (experimento 1) e 2) Avaliar a resistência de união da interface resina/dentina e sua morfologia após 24h, 6 e 12 meses de envelhecimento dos espécimes, a perda de massa seca e a resistência à degradação do colágeno (experimento 2). Lesões de cárie em dentina foram criadas pelo método de ciclagem do pH (14 dias) em 208 espécimes bovinos. Os espécimes foram divididos de acordo com método de remoção seletiva da lesão de cárie: broca (em baixa rotação) ou laser de Er:YAG (250 mJ/4Hz). Os espécimes receberam ácido fosfórico a 35%, e foram subdivididos de acordo com a biomodificação da dentina: sem biomodificação ou quitosana a 2,5%. No experimento 1, os espécimes foram submetidos às análises de Espectroscopia Eletrônica de Análise Química (EDS) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície e microdureza da subsuperfície dentinária. No experimento 2, os espécimes foram submetidos a resistência de união à microtração e MEV da interface adesiva após 24h, 6 e 12 meses de armazenamento em água, avaliação da perda de massa seca e liberação de hidroxiprolina (HYP). Os dados foram analisados por meio de testes paramétricos e não paramétricos ($\alpha=0.05$). A remoção seletiva da lesão de cárie com laser de Er: YAG promoveu aumento da microdureza da dentina afetada ($p=0,03$) e redução na quantidade de Ca ($0<0,0001$) e P ($0<0,0001$). A biomodificação com quitosana não influenciou a microdureza ($0,0796$) e a porcentagem atômica dos elementos Ca ($p=0,2269$) e P ($p=0,8842$) presentes na dentina residual. A análise em MEV mostrou alterações morfológicas na superfície de dentina ($p>0,05$). Após 24h, os maiores valores de resistência de união foram obtidos para a broca em comparação ao laser Er:YAG ($p<0,001$). Após 6 meses, os métodos foram semelhantes ($p=0,432$) e após 12 meses a resistência de união à dentina irradiada foi significativamente maior do que à dentina tratada com broca ($p=0,025$).

A biomodificação com quitosana aumentou significativamente a resistência de união à dentina após 6 ($p=0,011$) e 12 meses ($p<0,001$). A análise em MEV mostrou que a biomodificação com quitosana preservou a interface adesiva após 12 meses de armazenamento. A perda de massa seca ($p>0,664$; $p>0,263$) e a liberação de hidroxiprolina ($p>0,6347$; $p>0,4274$) não foram influenciadas, respectivamente, pelo método de remoção da cárie ou pela biomodificação dentinária. A remoção seletiva da dentina cariada com o laser de Er: YAG aumentou a microdureza da dentina afetada por cárie, alterando sua morfologia superficial e composição química. A biomodificação com quitosana não influenciou a composição estrutural e química da dentina residual. Após 24h de armazenamento em água, a resistência de união da resina composta à dentina foi afetada pelo laser de Er:YAG. No entanto, a resistência de união à dentina irradiada foi mantida, enquanto a dentina tratada com broca apresentou redução contínua. A biomodificação com quitosana, independente do método de remoção utilizado, preservou a resistência de união e a interface adesiva ao longo de 12 meses. O laser de Er:YAG e a biomodificação com quitosana não influenciaram na perda de massa seca e na liberação de hidroxiprolina

Palavras-chave: dentina cariada, interface adesiva, microtração, hidroxiprolina, microdureza.

ABSTRACT

Curylofo-Zotti, F.A. **Selective caries removal using Er:YAG laser and dentin biomodification with chitosan.** 2017. 95f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The aim of this study was to evaluate the effect of Er:YAG laser for selective removal of carious lesion, followed by biomodification with chitosan. The specific objectives were: 1) To evaluate the chemical elements and the morphology of the dentin surface, as well as, the subsurface microhardness (Experiment 1). 2) To evaluate the microtensile bond strength (μ TBS) and adhesive interface after 24h, 6 and 12 months of water storage, the dry mass loss and dentin collagen degradation (Experiment 2). Dentinal caries lesions were created in 208 bovine specimens by pH-cycling method (14 days). Specimens were divided according to the carious removal method: bur (low-speed handpiece) or Er:YAG laser (250 mJ/4Hz). Specimens were treated with 35% phosphoric acid and were subdivided according to dentin biomodification: without chitosan (control) and 2.5% chitosan. For the experiment 1, specimens were submitted to Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) and Scanning Electron Microscopy (SEM) and subsurface microhardness of the dentin. For the experiment 2, specimens were submitted to microtensile bond strength and SEM analysis of the adhesive interface after 24h, 6 and 12 months of storage in water, evaluation of dry mass loss and hydroxyproline release (HYP). Data were analyzed by parametric and non-parametric tests ($\alpha=0.05$). The selective caries removal with Er:YAG laser increased the microhardness value of caries-affected dentin ($p=0.03$) and reduced the amounts of Ca ($0<0.0001$) and P ($0<0.0001$). The biomodification with chitosan did not influence the microhardness (0.0796) and atomic percentage of Ca ($p=0.2269$) and P ($p=0.8842$) of residual dentin. SEM analysis showed morphological changes on dentin surface ($p>0.05$). After 24h, the highest bond strength values were found for bur compared to Er:YAG laser ($p<0.001$). After 6 months, methods were similar ($p=0.432$) and after 12 months, the highest bond strength values were found for Er:YAG laser-irradiated dentin ($p=0.025$). Biomodification with chitosan significantly increased bond strength to dentin after 6 ($p=0.011$) and 12 months ($p<0.001$). SEM analysis showed that the biomodification with chitosan preserved the adhesive interface after 12-month storage. The dry mass loss ($p>0.664$; $p>0.263$) and HYP release ($p>0.6347$; $p>0.4274$) were not influenced, respectively, by the carious removal method or by dentin biomodification. The selective removal of carious dentin with Er:YAG laser increased

microhardness of residual caries-affected dentin changing its surface morphology and chemical composition. The biomodification with chitosan did not influence the structural and chemical composition of residual dentin. After 24 hours of water storage, the composite resin bond strength to dentin was affected by Er:YAG laser. However, the bond strength to irradiated-dentin was maintained, while the bur-treated dentin showed a continuous reduction. Biomodification with chitosan, regardless of removal method used, preserved the bond strength and adhesive interface over 12 months. The dry mass and the hydroxyproline release were not influenced.

Key-words: carious dentin, adhesive interface, microtensile bond strength, hydroxyproline, microhardness.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	38
2. PROPOSIÇÃO	45
3. MATERIAL E MÉTODO	49
3.1 Experimento 1	49
3.2 Experimento 2	56
4. RESULTADOS	67
4.1 Experimento 1	67
4.2 Experimento 2	70
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A visão de máxima preservação do substrato dentário sadio em todos os procedimentos odontológicos representa um dos princípios fundamentais da odontologia minimamente invasiva (WALSH et al., 2013; SCHWENDICKE et al., 2016). Para tanto, uma abordagem mais cautelosa durante a remoção do tecido cariado torna-se fundamental, bem como, a distinção clínica entre as camadas de dentina cariada. A camada mais externa (ou dentina infectada) apresenta-se como um tecido necrótico, desmineralizado e com rompimento irreversível da sua estrutura de colágeno, enquanto a camada mais interna (ou dentina afetada) apresenta-se parcialmente desmineralizada e mantém sua estrutura tubular íntegra, sendo passível de remineralização (FUSAYAMA, 1979).

No que diz respeito ao máximo de intervenção com tratamentos minimamente invasivos (WALSH et al., 2013), a distinção clínica entre o que deve ser removido e o que pode ou convém ser preservado durante a remoção do tecido cariado torna-se importante, pois cavidades minimamente invasivas, além de evitar a remoção desnecessária de estrutura dental, favorecem os procedimentos adesivos (KIDD et al., 2004).

A técnica de remoção seletiva de tecido cariado é interessante e preferível, quando comparada à remoção total do tecido cariado, uma vez que, os substratos dentários sadios são preservados, promovendo menor risco de exposição pulpar (RICKETTS et al., 2006; THOMPSON et al., 2008), estimulando o processo de esclerose tubular e deposição de dentina terciária, reduzindo assim a permeabilidade da dentina remanescente (KIDD, 2004). Nesse sentido, há uma busca constante por procedimentos que além favorecer uma adequada remoção do tecido cariado e os procedimentos restauradores, também minimizem características indesejáveis inerentes ao uso de aparelhos rotatórios convencionais, tais como ruídos, dor, superaquecimento, vibração e sensação de desconforto para o paciente (BANERJEE et al., 2000; KIRZIOGLU et al., 2007).

O laser de Er:YAG vem sendo utilizado para remoção de lesões de cárie em dentes permanentes (ZHEGOVA et al., 2014; CURYLOFO-ZOTTI et al., 2017) e decíduos (TANBOGA et al., 2011; VALÉRIO et al., 2016), eliminando a vibração, pressão e os ruídos durante o preparo cavitário (MERIGO et al., 2015) sendo preferível e bem aceito pelos pacientes (FORNAINI et al., 2012), uma vez que elimina a necessidade de anestesia local na maior parte dos casos (MERIGO et al., 2015).

O laser de Er:YAG possui comprimento de onda de 2,94 μm , o qual coincide com o pico máximo de absorção da água e dos radicais hidroxila presentes na hidroxiapatita (PAGHDIWALA, 1991) permitindo uma remoção efetiva do tecido cariado (SCHWASS et al., 2013; RAUCCI-NETO et al., 2015; VALÉRIO et al., 2016) por meio de micro explosões originadas da evaporação da água contida no tecido mineralizado (HIBST; KELLER, 1989).

Este sistema é capaz de aumentar a microdureza da dentina, bem como, a quantidade de cálcio (MOOSAVI et al., 2016). No entanto, alterações nos componentes orgânicos e na água ocorrem em maiores proporções quando em comparação as alterações encontradas para os componentes inorgânicos (SASAKI et al., 2002). A irradiação da dentina com laser de Er:YAG é capaz de promover ausência de *smear layer* e exposição de túbulos dentinários (TAKEDA et al., 1998), o que poderia resultar em aumento da resistência de união a dentina (CELIK et al., 2006; CHEN et al., 2015). No entanto, apesar da eficácia durante a ablação, a interação dos sistemas adesivos com a dentina irradiada, bem como, o impacto do laser de Er:YAG sobre as fibras colágenas não estão totalmente esclarecidos. A irradiação com laser de YAG promove alteração no conteúdo de colágeno (CEBALLOS et al., 2002; ARANHA et al., 2007; HE et al., 2017), reduzindo os componentes orgânicos da dentina. Assim, a presença de uma camada de dentina subsuperficial irradiada poderia ter um efeito deletério na resistência de união da resina à dentina (FERREIRA et al., 2010; HE et al., 2017) interferindo diretamente na interação do monômero resinoso com as fibras de colágeno expostas (SCHEIN et al., 2003).

Outro fator importante a ser considerado é que a resistência de união à dentina afetada por cárie é complexa devido a alterações nas características químicas e morfológicas deste substrato (NAKAJIMA et al., 2011). Independentemente do tipo de sistema adesivo utilizado, a dentina afetada por cárie produz valores de resistência de união mais baixos, além de uma camada híbrida de baixa qualidade (SCHOLTANUS et al., 2010; AGGARWAL et al., 2016; NICOLOSO et al., 2017). Essas características podem afetar a longevidade das restaurações adesivas, as quais durante a exposição ao ambiente oral estão mais suscetíveis à degradação da interface adesiva (NAKAJIMA et al., 2011) pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) derivadas do hospedeiro, uma classe de endopeptidases dependentes de cálcio e zinco (TJÄDERHANE et al., 1998; VAN STRIJP et al., 2003; LONGHI et al., 2015).

Neste sentido, a biomodificação da dentina é uma estratégia promissora para o reforço da matriz de colágeno (XU et al., 2011; PROFETA et al., 2012; KISHEN et al., 2016). A quitosana é um biopolímero policatiônico obtido por meio de desacetilação alcalina da

quitina, que é o principal componente do exoesqueleto dos crustáceos (MUZZARELLI et al., 1973) sendo facilmente encontrada na natureza, com baixo custo (PETER et al., 1995).

Este biopolímero (copolímero de β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina e β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina) possui um elevado número de grupos hidroxila e amino livre (DOMARD, 2011). Estes grupos podem interagir com o colágeno para formar ligações químicas (CHEN et al., 2015). A incorporação de quitosana na matriz colágena da dentina é capaz de promover propriedades mecânicas superiores em comparação com o controle positivo (glutaraldeído), e inibir a degradação de matrizes de colágeno por *Clostridium histolyticum* (KISHEN et al., 2016). Além disso, os grupos amino conferem carga positiva (catiônica) a quitosana; proporcionando uma alta reatividade sobre partículas ou superfícies aniônicas (por exemplo, bactérias e biofilmes), o que potencializa sua propriedade antimicrobiana (ELSAKA et al., 2012). A quitosana é um composto totalmente biocompatível, apresenta baixa toxicidade aos tecidos (RINAUDO, 2006; RAAFAT; SAHL, 2009) e capacidade quelante (RABEA et al., 2003; SILVA et al., 2012).

Sabe-se que a quitosana pode melhorar a remineralização pela deposição de íons cálcio e fósforo sobre a superfície de dentina desmineralizada, assim, a utilização deste biopolímero na tentativa de obter propriedades de superfície favoráveis para nucleação de cristais torna-se um método promissor para remineralização de lesões superficiais em dentina (XU et al., 2011), este benefício somado ao fato da quitosana apresentar atividade antimicrobiana, poderia ser uma vantagem adicional quando utilizada em substrato de dentina cariada (SANO et al., 2001).

Desta forma, considerando os benefícios da utilização do laser de Er:YAG para remoção seletiva do tecido cariado, torna-se relevante avaliar a biomodificação da dentina afetada por cárie com quitosana a fim de investigar seus efeitos na microdureza da subsuperfície dentinária, na composição química, na resistência de união a microtração, na perda de massa seca, na degradação do colágeno dentinário, na morfologia da superfície e da interface adesiva.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo *in vitro* teve como objetivo geral avaliar o efeito da remoção seletiva da lesão de cárie utilizando laser de Er:YAG e da biomodificação da dentina com quitosana. Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar os elementos químicos, a morfologia da superfície dentinária e a microdureza da subsuperfície.
2. Avaliar a resistência de união da interface resina/dentina e sua morfologia após 24h, 6 e 12 meses de envelhecimento dos espécimes, bem como, a perda de massa seca e resistência à degradação do colágeno.

Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Experimento 1

Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram o método empregado para a remoção seletiva da lesão de cárie, em dois níveis: laser de Er:YAG e broca em baixa rotação (método convencional) e a biomodificação da dentina, em dois níveis: quitosana a 2,5% e sem quitosana. A amostra do experimento foi composta por 104 incisivos bovinos divididos aleatoriamente em 4 grupos.

O delineamento foi realizado em blocos completos casualizados. As variáveis de resposta quantitativas foram: análise da microdureza (KHN) da superfície dentinária (n=10), avaliação da porcentagem atômica (at. %) de cálcio (Ca) e fósforo (P) da superfície dentinária por meio de espectroscopia eletrônica de análise química (EDS) (n=10) e análise da morfologia da superfície por meio de microscopia eletrônica de varredura (n=6). O fluxograma do experimento está ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma do experimento 1.

Seleção dos dentes

Foram utilizados incisivos bovinos conservados em solução de timol 0,1% a 9°C, os quais foram lavados em água corrente por 24 horas para eliminação dos resíduos de timol e examinados macroscopicamente com auxílio de lupa estereoscópica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) em aumento de 20×. Foram selecionados 104 incisivos que não apresentassem linhas de fratura ou fissuras profundas na coroa.

Preparo da amostra

Os dentes foram seccionados transversalmente na junção amelocementária para separar as coroas das raízes, utilizando disco diamantado montado em máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, Alemanha). Posteriormente, as coroas dentais foram seccionadas longitudinalmente no sentido méso-distal. A hemi-secção da face vestibular da coroa de cada dente foi seccionada de forma a se obter 1 espécime de 5 x 5 x 2,5 mm de dentina da face vestibular de cada coroa.

Os fragmentos dentais foram devidamente fixados em matrizes de resina acrílica utilizando-se cera fundida, de forma que a superfície de dentina permanecesse voltada para o meio externo (HARA et al., 2003). Posteriormente, as superfícies foram polidas em Politriz giratória (DP-9U2, Struers S/A, Copenhagen, Dinamarca) refrigerada à água com lixas d'água de granulação 1200 (Hermes Abrasives Ltd., VA, EUA) e pasta de alumina 0.3µm e 0.05µm (Arotec S/A Ind. Com., São Paulo, Brasil) em feltro polidor (ATM, Altenkirchen, Alemanha) (Figura 2).

Figura 2 - A. Secção do dente para obtenção dos espécimes. B. Fixação do espécime com cera em suporte de resina acrílica e polimento da superfície de dentina. C Espécime de dentina com tamanho de 5 x 5 x 2,5 mm.

Análise de microdureza

Para que os espécimes fossem padronizados em relação aos valores de microdureza das subsuperfícies dentais, foram realizadas três endentações na lateral dos fragmentos (subsuperfícies) distantes 30µm da superfície e 100µm uma da outra no microduromêtro HMV-2000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (HARA et al., 2006) com penetrador de diamante para dureza Knoop (KHN) e célula de carga de 25 gramas durante 5 segundos (RODRIGUES et al., 2006). A média das medidas foi utilizada como valor de microdureza do espécime, sendo que os espécimes que apresentaram valor médio 20% acima ou 20% abaixo ao valor geral de todos os espécimes foram descartados (DE MENEZES et al., 2007). A análise de microdureza da subsuperfície foi realizada em quatro momentos: na dentina hígida, na dentina afetada por cárie, após a remoção seletiva da lesão de cárie (dentina residual) e, após a restauração dos espécimes.

Indução das lesões de cárie artificiais

As lesões artificiais em dentina foram criadas pelo método de ciclagem do pH, segundo protocolo descrito por MARQUEZAN et al., 2009 . A solução desmineralizante foi composta por 2 mM de CaCl_2 , 2.2 mM de NaH_2PO_4 e 50 mM de ácido acético com pH ajustado para 4.8. A solução remineralizante foi composta por 1.5 mM de CaCl_2 , 0.9 mM de NaH_2PO_4 e 0.15M de KCl com pH em torno de 7.0. Cada espécime foi ciclado em 10 mL de solução, sendo 8h em solução desmineralizante e 16h em solução remineralizante. Este procedimento foi realizado por 14 dias em temperatura ambiente. Após a indução lesão de cárie, a análise de microdureza foi realizada conforme descrito anteriormente.

Divisão dos grupos experimentais

Os 104 espécimes de dentina afetada por cárie foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de acordo com o método utilizado para remoção seletiva da lesão de cárie: laser de Er:YAG ou broca, e de acordo com a biomodificação da dentina: quitosana e sem quitosana. Dos 104 espécimes, 40 foram destinados à análise de microdureza da subsuperfície dentinária, 40 à análise de EDS e os 24 espécimes restantes foram destinados à análise em MEV.

Remoção seletiva da lesão de cárie

A remoção seletiva do tecido cariado foi realizada na camada superficial de dentina cariada ($\cong 150 \mu\text{m}$ de profundidade) com o auxílio de um marcador de passo automático

(MPC ElQuip, São Carlos, São Paulo, Brazil) que permitiu irradiação uniforme de toda a área de modo padronizado.

Para os grupos que receberam laser para a remoção seletiva da lesão de cárie, foi utilizado laser de Er:YAG (Fidelis Er III, Fotona, Ljubljana, Slovenia) em modo MSP, utilizando ponta R02 (Fotona, Ljubljana, Eslovenia), em modo não-contato, distância de irradiação de 7mm, desfocado, energia pulsátil de 250 mJ, frequência de pulsos de 4 Hz, diâmetro de saída do feixe de 0,9 mm, densidade de energia de 39 J/cm^2 , com fluxo de água de 6 mL/min e $6 \text{ m}^3/\text{min}$ de ar (VALERIO et al., 2016; CURYLOFO-ZOTTI et al., 2017).

Para os grupos em que a remoção de lesão de cárie foi realizada com contra ângulo (método convencional), foi utilizada broca carbide esférica #8 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em baixa rotação (Contra ângulo 1:1 L micro-series, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil (Figura 3). Após a remoção seletiva da lesão de cárie, a análise de microdureza foi realizada conforme descrito anteriormente.

Figura 3 – Remoção seletiva da lesão de cárie em espécime de dentina. A. Contra-ângulo (método convencional) com broca carbide esférica inclinada em aproximadamente 30°. B. Laser de Er:YAG (250 mJ/4Hz) posicionado a 7 mm da superfície dentinária.

Preparo da quitosana a 2,5% e biomodificação da dentina

Foram pesadas 2,5 gramas de quitosana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) de baixo peso molecular (75-85% de desacetilação) (CHUNG et al., 2016), a qual foi adicionada lentamente a 100 mL de solução de ácido acético 1% sob agitação magnética (Marconi Equip. Lab. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) durante 20 min de agitação (tempo suficiente para solubilizar o polissacarídeo). A solução foi preparada no Laboratório de Pesquisas em Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP-USP.

Em todos os espécimes, foi realizada aplicação de ácido fosfórico 35% (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) na dentina por 15 segundos, seguido de lavagem com água destilada pelo mesmo tempo e secagem com papel absorvente.

Para espécimes que receberam a biomodificação da dentina, este procedimento foi realizado com quitosana a 2,5%. Para tal, o gel foi aplicado sobre a dentina, permanecendo sobre a superfície por 1 min, seguido por lavagem com água destilada por 15 segundos e secagem com papel absorvente (Figura 4).

Figura 4 – A. Aplicação de ácido fosfórico a 35%. B. Biomodificação da dentina com gel de quitosana 2,5%.

Procedimento restaurador

Duas camadas do adesivo (Single Bond Universal, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foram aplicadas na superfície dentinária com microbrush nº 2 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil) de forma ativa com posterior evaporação do solvente. Em seguida, foi realizada fotopolimerização por 10 segundos (Optlight Max Gnatus 480nm, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

As superfícies de dentina foram restauradas com resina composta Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), incluída em incrementos de 2 mm com auxílio de espátula nº 1 (Duflex SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) polimerizada por 20 segundos em cada incremento, mantendo-se a extremidade do aparelho à distância de 1 milímetro da superfície da resina com auxílio de dispositivo próprio (Figura 5). Os espécimes restaurados foram mantidos em umidade relativa a 4 °C por 24 horas. Após 24 horas, a análise de microdureza foi realizada conforme descrito anteriormente.

Figura 5 – A. Inserção da resina composta. B. Espécime restaurado.

Espectroscopia Eletrônica de Análise Química (EDS)

A leitura por meio de EDS se baseia na emissão de energia proveniente de átomos e íons excitados para identificação e quantificação dos elementos químicos presente em uma amostra. Os espécimes foram secos a temperatura ambiente e fixados em *stubs* com fita dupla-face de carbono. A superfície dentinária foi analisada em aumento de 500× por meio de Microscópio Eletrônico de Varredura com detector de Espectrometria de Energia Dispersiva (EDS) acoplado (EVO 50, Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra) pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP e a porcentagem atômica (at.%) dos elementos Ca e P foi determinada.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície dentinária

Os espécimes foram imersos em solução contendo 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão de cacodilato de sódio com pH 7,4 (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 12 horas. Os espécimes foram desidratados em uma sequência crescente de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, SP, Brasil): 20% (20 min), 50% (20 min), 75% (20 min), 95% (30 min), e 100% (60 min). Em seguida, os espécimes foram imersos em HDMS (Hexamethyldisilazane — Merck KgaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos. Por fim, os espécimes foram fixos novamente em *stubs* metálicos e cobertos com fina camada da liga ouro-paládium em aparelho de metalização a vácuo (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein).

A área mais representativa de cada espécime foi fotografada em aumento de 1500×. As imagens foram quantitativamente analisadas por dois examinadores cegos para os grupos experimentais, e que não participaram da fase experimental. A reprodutibilidade

intraexaminadores foi de 0,95 para o examinador A, e 0,90 para o examinador B, o que indica uma calibração quase perfeita. O valor de kappa indicou reprodutibilidade substancial entre interexaminadores (0,88 entre A e B). Para orientar os examinadores durante a análise morfológica, os escores foram estabelecidos com base nas características dentinárias, de acordo com um estudo anterior utilizando laser (SOUZA-GABRIEL et al., 2009) (Tabela 1).

Tabela 1 Critérios utilizados para classificar o aspecto morfológico da superfície dentinária.

Escore	Critério
1	<i>Smear layer</i> recobrindo a dentina Túbulos dentinários totalmente visíveis
2	<i>Smear layer</i> recobrindo a dentina Maior parte dos túbulos aberta
3	<i>Smear layer</i> recobrindo a dentina Maior parte dos túbulos obliterada
4	Ausência da camada de matriz orgânica modificada recobrindo a dentina Túbulos dentinários totalmente visíveis Superfície irregular
5	Camada de matriz orgânica modificada recobrindo a dentina Maior parte dos túbulos aberta Superfície irregular e derretimento
6	Camada de matriz orgânica modificada cobrindo a dentina Maior parte dos túbulos obliterada Superfície irregular e derretimento

Análise estatística

Todos os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (Levene), bem como a análise de distribuição por meio de boxplots e histogramas. Os dados obtidos pelo teste de microdureza não se aproximaram da distribuição normal, assim, testes não paramétricos foram utilizados. O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar diferenças entre as condições de tratamento no mesmo espécime. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre os grupos experimental e controle. Os dados obtidos pela análise de EDS seguiram distribuição normal e foram analisados por ANOVA dois fatores. O teste de Tukey foi utilizado para múltiplas comparações entre as

médias. Os dados obtidos por meio de MEV foram analisados por meio de Teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado para todos os testes foi 5% e os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS versão 20.0 (SPSS Inc., v20, Chicago, IL, EUA).

3.2 Experimento 2

Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram o método empregado para a remoção seletiva da lesão de cárie, em dois níveis: laser de Er:YAG e broca em baixa rotação (método convencional), a biomodificação da dentina, em dois níveis: quitosana a 2,5% e sem quitosana e o tempo de envelhecimento da interface adesiva em três níveis: 24h, 6 meses e 12 meses. A amostra do experimento foi composta por 80 incisivos bovinos divididos aleatoriamente em 4 grupos. O delineamento foi realizado em blocos completos casualizados.

As variáveis de resposta quantitativas foram: 1) análise da resistência de união a microtração (Mpa) após 24h, 6 meses ou 12 meses de envelhecimento, 2) análise de falhas, 3) análise da perda de massa seca (mg) e 4) análise da degradação do colágeno dentinário por meio da quantificação da liberação de hidroxiprolina (ng HYP/mg dentina), e como variável qualitativa, 5) análise da interface adesiva por meio de microscopia eletrônica de varredura após 24h, 6 meses ou 12 meses de envelhecimento. O fluxograma do experimento está ilustrado na figura 6.

Figura 6 - Fluxograma do experimento 2.

Seleção dos dentes, preparo da amostra e indução da lesão de cárie artificial

Estas etapas foram realizadas da mesma maneira como descrito para o experimento 1. No entanto, para as análises realizadas no experimento 2, foram obtidos espécimes com 6 x 6 x 2,5mm.

Divisão dos grupos experimentais

Os 80 espécimes de dentina afetada por cárie foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o método utilizado para remoção seletiva da lesão de cárie: laser de Er:YAG ou broca, biomodificação da dentina: quitosana e sem biomodificação, e o tempo

de envelhecimento da interface adesiva: sem envelhecimento (testes realizados após 24 horas) e com envelhecimento (testes realizados após 6 ou 12 meses de armazenamento em água). Dos 104 espécimes, 76 foram restaurados com resina composta, destes, 40 foram destinados à análise de microtração e 36 a análise de microscopia eletrônica de varredura. Os 28 espécimes restantes, foram destinados às análises da perda de massa seca e degradação do colágeno dentinário.

Remoção seletiva da lesão de cárie, preparo da quitosana a 2,5% e biomodificação da dentina

Estas etapas foram realizadas da mesma maneira como descrito para o experimento 1.

Procedimento restaurador

Setenta e seis espécimes foram restaurados utilizando sistema adesivo (Single Bond Universal, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA). Duas camadas de adesivo foram aplicadas na dentina com microbrush nº 2 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil) de forma ativa com posterior evaporação do solvente, seguida de fotopolimerização (Gnatus Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 10 segundos.

As superfícies de dentina foram restauradas com resina composta Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), incluída em incrementos de 2 mm com auxílio de espátula nº 1 (Duflex SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) polimerizada (Gnatus Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 20 segundos em cada incremento, mantendo-se a extremidade do aparelho à distância de 1 mm da superfície da resina com auxílio de dispositivo próprio. Após a restauração, os espécimes foram mantidos em umidade relativa a 4 °C por 24 horas.

Secção dos espécimes e envelhecimento da interface adesiva

Os espécimes (conjunto dentina/restauração) foram seccionados com irrigação constante no sentidos x e y em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). As extremidades da restauração foram descartadas e foram obtidos no mínimo 12 palitos de $1,0 \pm 0,2$ mm² de área transversal, extraídos da porção central do espécime (PROFETA et al., 2012). A espessura do palito foi confirmada com um paquímetro digital (Mitutoyo, Toquio, Japão). Os 480 palitos obtidos (12 palitos de cada espécime, 10 espécimes por grupo) foram submetidos a 24 horas, 6 e 12 meses de envelhecimento hidrolítico da interface, para tal, foram armazenados em 20 mL água destilada a 37°C em estufa por 24 horas 6 ou 12 meses, com troca da água semanalmente (PROFETA et al., 2012).

Ensaio de resistência de união a microtração (μ TBS)

Cada palito foi individualmente fixado em dispositivo de aço inoxidável com adesivo cianoacrílico (Super Bonder; Henkel Ltda, São Paulo, SP, Brasil). O dispositivo metálico foi adaptado em uma máquina universal de ensaios (Instron Corporation, Canton-Massachusetts, EUA) com célula de carga de 50 Kg/f, com força de tração com velocidade de 0,5 mm/min até a falha (Figura 6). O valores de resistência adesiva foram expressos em megapascal (MPa), fornecidos pelo programa por meio do cálculo das secções transversais dos palitos, medidas previamente ao teste.

As superfícies envolvidas na fratura de cada espécime foram analisadas em estereomicroscópio (Leica S6 D Stereozoom, Leica Microsystems AG, Suíça) em aumento de 40× para classificação quanto ao padrão de fratura. Foram classificadas em adesiva, quando a superfície dentinária estivesse coberta por fina camada de material adesivo; coesiva da dentina, quando a falha ocorrer na dentina; e mista, nas situações em que houver a combinação dos tipos adesiva e coesiva.

Figura 6 – A. Espécime fixado em dispositivo de aço inoxidável posicionado em máquina universal de ensaios. B. e C. Espécime previamente e após o teste de microtração.

Microscopia eletrônica de varredura da interface adesiva

Com objetivo de analisar o comportamento da interface adesiva após 24h, 6 e 18 meses de envelhecimento hidrolítico, os espécimes foram lavados em água destilada, e imersos em solução contendo 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão de cacodilato de

sódio com pH 7,4 (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Germany) por 12 horas. Os espécimes foram desidratados em uma sequência crescente de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, SP, Brasil): 20% (20 min), 50% (20 min), 75% (20 min), 95% (30 min), e 100% (60 min). Em seguida, foram imersos em HDMS (Hexamethyldisilazane — Merck KgaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos. Após, os espécimes foram fixos em *stubs* metálicos e cobertos com fina camada da liga *ouro-paladium* em aparelho de metalização a vácuo (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein).

Foi realizada análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (EVO 50; Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra) pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP. Foi realizada a varredura de toda interface adesiva foi realizada e a área mais representativa de cada espécime foi fotografada em aumento de $1.500\times$.

Perda de massa seca

Vinte e oito espécimes de dentina ($n=7$) foram seccionados em palitos ($1,0\text{ mm} \pm 0,2\text{ mm}$) e desmineralizados em solução de ácido fosfórico 10% ($\text{pH}=1$) por 18 h a 4°C em homogeneizador. Após, os palitos foram lavados em água deionizada por 2 h (com trocas de água a cada 30 min), permanecendo a 4°C em homogeneizador. Em seguida, foram biomodificados ou não com quitosana, como descrito anteriormente. Os palitos foram colocados em dessecador contendo sulfato de cálcio anidro (Drierite, WA Hammond Drierite Company, Ltd., Xenia, OH, EUA) por 72 horas. A massa seca inicial de cada palito foi determinada por uma balança de microanálise com a precisão de 0,01 mg. Em seguida, os palitos foi reidratados em água destilada por 1 h e armazenados em tubos plásticos contendo 500 μl de saliva artificial, sob agitação à 37°C por 7 dias. Após este período, o colágeno foi novamente desidratado e a massa seca final medida. Desta forma, a perda de massa seca após armazenagem foi determinada pela diferença entre a massa seca inicial e a massa seca final (Δ_m).

Liberção de hidroxiprolina (HYP)

Para quantificação da concentração de hidroxiprolina liberada, uma placa contendo 300 μl do meio de armazenamento dos palitos (saliva artificial), foi colocada em dessecador contendo sulfato de cálcio anidro (Drierite, WA Hammond Drierite Company, Ltd., Xenia, OH, EUA) até a completa evaporação do meio. Após a completa evaporação do meio, 70 μl de água ultrapura foi adicionado em cada poço, e as amostras foram ressuspensas. Em

seguida, 60 µl de cada amostra foram individualmente transferidos para tubos devidamente nomeados. Um volume de 60µl de ácido clorídrico (HCl) 12 M foi acrescentado a cada tubo, e a solução resultante foi incubada em banho seco a 120 °C (K80-S02, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) durante 3 horas para hidrolisar os aminoácidos. Após esfriamento, os tubos foram abertos e 5 mg de carvão ativado (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) foram adicionados a cada amostra, a qual foi centrifugada a 13000 xg por 2 minutos. Coletou-se 40 µl do sobrenadante, o qual foi transferido para uma placa de 96 poços. Para análise da liberação de HYP, utilizou-se um teste colorimétrico (MAK008-1KT, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Uma curva-padrão foi construída visando à quantificação da hidroxiprolina liberada no meio de armazenamento dos espécimes. Dez µl de uma solução padrão de hidroxiprolina com concentração de 1 mg/ml foi diluída em 90 µl de água destilada para preparar uma solução de hidroxiprolina a 0,1 mg/ml. A curva foi construída adicionando-se 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µl da solução final (0,1 mg/ml) em uma placa de 96 poços de forma que os padrões gerados corresponderam às concentrações de 0 (blank); 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 g de hidroxiprolina/poço. A placa foi colocada em um dessecador a vácuo contendo pastilhas de hidróxido de sódio (NaOH) para aprisionar o vapor de HCl e de sulfato de cálcio anidro para aprisionar o vapor de água até a completa evaporação do conteúdo. Após a evaporação, foram adicionados em cada poço, 100 µL da solução de Cloramina T e após 5 minutos, foram acrescentados 100 µL do reagente DMAB, seguido de incubação por 90 minutos a 60 °C (a placa permaneceu com tampa). O conteúdo resultante teve sua absorbância lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm (Synergy HT microplate reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) para verificação da concentração e com base na curva-padrão, os resultados foram expressos em ng HYP/mg dentina (Figura 7).

Figura 7 – A e B. Palitos de $1,0 \text{ mm} \pm 0,2 \text{ mm}$ fixados com cera em recipiente padronizado para indução da lesão de cárie. C. Palitos em solução de ácido fosfórico 10% a 4°C em homogeneizador. D. Palitos em placas de 96 poços após biomodificação. E. Placa em dessecador contendo sulfato de cálcio anidro. F. Balança de microanálise com a precisão de 0,01 mg utilizada para pesagem dos palitos. G. Palito após desmineralização. H. Placa de 96 poços contendo os padrões e as amostras, previamente a leitura para quantificação da liberação de hidroxiprolina. I. Absorbância lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm.

Análise estatística

Todos os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk), bem como análise de distribuição por meio de boxplots e histogramas. Para os dados obtidos por meio da análise de microtração, foi aplicada a técnica de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas por meio do ajuste de modelo linear generalizado com três fatores (método de remoção vs biomodificação vs tempo de envelhecimento da interface adesiva). Teste de Bonferroni foi aplicado para as comparações múltiplas de médias dos efeitos significativos. Para os dados obtidos por meio da análise de perda de massa seca foi aplicada a técnica de análise de variância para dois fatores (método de remoção vs biomodificação), seguido de Teste de Bonferroni. Para análise da liberação de hidroxiprolina, os dados apresentaram distribuição não normal, desta forma, foi aplicado teste de Mann-Whitney,

seguido de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos. Em todos os testes estatísticos, foi adotado o nível de significância de 5% e os dados foram analisados por meio do sistema SPSS versão 20.0 (SPSS Inc., v20, Chicago, IL, EUA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1

A figura 8 mostra os intervalos de confiança (IC 95%) para a microdureza da subsuperfície dentinária obtida em quatro momentos: na dentina hígida, na dentina afetada por cárie, após a remoção seletiva da lesão de cárie (dentina residual) e, após a restauração dos espécimes. A sobreposição dos intervalos demonstra que após a indução da lesão de cárie, ambos os grupos apresentaram redução da microdureza da superfície dentinária. Após a remoção seletiva da lesão de cárie (dentina residual), o grupo laser de Er:YAG diferiu do que grupo broca, pois seus intervalos não se sobrepõem. Intersecções em todos os intervalos foram encontradas após a biomodificação da superfície e restauração da dentina.

Figura 8 - Intervalos de confiança (IC 95%) das medidas da microdureza.

A indução de lesões cariosas artificiais promoveu uma redução da microdureza ($p < 0,01$) da dentina. Na comparação entre os métodos utilizados para remoção seletiva da lesão de cárie, após a escavação laser de Er:YAG, o valor de microdureza da dentina residual foi maior ($p = 0,03$) (Tabela 2).

Tabela 2 Média (desvio-padrão) da microdureza da subsuperfície dentinária (n=20).

Condição da dentina	Broca	Laser de Er:YAG
Hígida	52,75 (7,23) a	55,29 (6,56) a
Dentina afetada por cárie	15,74 (5,7) b	14,38 (4,92) b
Dentina residual	22,14 (7,31) c	33,38 (11,7) d

Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre linhas e colunas (Teste Mann-Whitney, $p>0,05$).

A biomodificação da dentina residual afetada por cárie, seguida pelo procedimento restaurador, não alterou a microdureza da subsuperfície dentinária ($p=0,796$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Média (desvio-padrão) da subsuperfície dentinária após a biomodificação e restauração da dentina (n=10).

Condição da dentina	Broca	Laser de Er:YAG
Sem quitosana	24,77 (14,31)	29,56 (14,18)
Quitosana	36,69 (20,16)	35,58 (15,87)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

O laser de Er:YAG promoveu uma redução na quantidade de cálcio (Ca) ($p<0,0001$), fósforo (P) ($p<0,0001$), bem como, na relação cálcio/fósforo (Ca/P) ($p=0,0003$) em comparação a broca. A biomodificação não influenciou a porcentagem atômica de cálcio ($p=0,2269$) fósforo ($p=0,8842$) e a relação cálcio/fósforo ($p=0,3421$) da dentina residual afetada por cárie (Tabela 4).

Tabela 4 Médias (desvio-padrão) da porcentagem atômica (at.%) dos elementos quantificados após os tratamentos (n=10).

Elementos	Broca		Laser de Er:YAG	
	Sem quitosana	Quitosana	Sem quitosana	Quitosana
Ca	8,54 (5,44) a	8,52 (7,03) a	1,6 (0,7) b	1,2 (0,41) b
P	4,43 (2,52) a	4,17 (2,91) a	1,67 (1,51) b	1,12 (0,71) b
Ca/P	1,81 (0,27) a	1,75 (0,51) a	1,31 (0,18) b	1,37 (0,31) b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre broca e o laser de Er:YAG, comparação apenas entre colunas (Two-way ANOVA, teste de Tukey, $p>0,05$).

A análise quantitativa da superfície dentinária por meio de MEV demonstrou não haver diferenças entre a remoção seletiva da lesão de cárie com broca com ou sem biomodificação com quitosana ($p>0,05$, Tabela 5). Após a remoção seletiva da lesão de cárie com broca em baixa-rotação, 83,4% dos espécimes apresentaram *smear layer* recobrindo a superfície de dentina, porém com túbulos dentinários totalmente visíveis ou com a maior parte dos túbulos abertos (Tabela 5, Figura 9). A biomodificação com quitosana não influenciou a dentina, pois 83,3% dos espécimes apresentaram *smear layer* recobrindo a superfície dentinária, dos quais 33,3% apresentaram túbulos totalmente visíveis e 50% a apresentaram a maior parte dos túbulos abertos (Tabela 5, Figura 9).

Resultados mais intensos foram encontrados para a remoção seletiva da lesão de cárie com laser de Er:YAG, seguida da biomodificação com quitosana ($p<0,05$, Tabela 5, Figura 9). Após a remoção seletiva da lesão de cárie com laser de Er:YAG, 66,7% das superfícies apresentaram superfície irregular com uma camada de matriz orgânica modificada recobrindo a dentina, porém com os túbulos totalmente visíveis (Tabela 5, Figura 9). Após a biomodificação com quitosana na dentina afetada pela cárie, 100% dos espécimes apresentaram um derretimento na superfície e uma camada de matriz orgânica modificada recobrindo dentina. Os túbulos apresentaram-se totalmente visíveis (33,3%) ou a maior parte permaneceu aberta (66,7%). O derretimento foi encontrado em 50% das superfícies da dentina (Tabela 5, Figura 9).

Tabela 5 Mediana atribuída aos diferentes tratamentos (n=6) e distribuição de frequência para cada score (%).

Score	Broca		Laser de Er:YAG	
	Sem quitosana	Quitosana	Sem quitosana	Quitosana
1	1,0 (16,7)	2,0 (33,3)	-	-
2	4,0 (66,7)	3,0 (50,0)	-	-
3	1,0 (16,7)	1,0 (16,7)	2,0 (33,3)	-
4	-	-	4,0 (66,7)	2,0 (33,3)
5	-	-	-	3,0 (50,0)
6	-	-	-	1,0 (16,7)
Mediana*	2,0 b	2,0 b	4,0 ab	5,0 a

* Letras diferentes indicam diferenças significativas entre colunas. Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls, $p>0,05$.

Figura 9 - Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. Remoção seletiva da lesão de cárie com broca: A. sem biomodificação e B. após biomodificação com quitosana. Remoção seletiva da lesão de cárie com laser de Er: YAG: C. sem biomodificação e D. após biomodificação com quitosana. Imagens em aumento de 1.500×. ➡ Indica irregularidades na superfície. ► Indica *smear layer* recobrindo a dentina. * Indica áreas de derretimento

4.2 Experimento 2

A tabela 6 demonstra as comparações estatísticas obtidas entre os fatores: método de remoção, biomodificação da dentina e tempo de envelhecimento da interface adesiva.

Tabela 6 Comparações estatísticas obtidas pela Análise de Variância.

Fator	F	Valor de p
Tempo	188,504	<0,001
Tempo vs Método	13,159	<0,001
Tempo vs Biomodificação	3,104	0,051
Tempo vs Método vs Biomodificação	2,676	0,076
Método	5,001	0,032
Biomodificação	21,366	<0,001
Método vs Biomodificação	0,670	0,419

Houve diferença significativa entre os valores de μ TBS obtidos após remoção seletiva da lesão com broca ($10,02 \pm 10,55$) e laser Er:YAG ($8,88 \pm 3,04$) ($p=0,032$). A biomodificação com quitosana ($10,63 \pm 7,68$) aumentou significativamente a resistência de união à dentina em comparação ao grupo sem biomodificação ($8,27 \pm 12,33$) ($p<0,001$). A resistência de união à dentina apresentou redução ao longo do tempo, sendo os maiores valores foram encontrados, respectivamente, para o período de 24h ($15,17 \pm 2,72$), 6 meses ($7,63 \pm 2,38$) e 12 meses ($5,56 \pm 2,15$) ($p<0,001$).

A interação entre os fatores método vs tempo foi significativa. Após 24h de armazenamento, os maiores valores de μ TBS foram obtidos para a broca em comparação ao laser Er:YAG ($p<0,001$). Após 6 meses, não foi encontrada diferença significativa entre os métodos de remoção ($p=0,432$). No entanto, após 12 meses a μ TBS a dentina irradiada foi significativamente maior do que a dentina tratada com broca ($p=0,025$). Ao comparar os tempos para cada método de remoção, verificou-se que a remoção com broca promoveu redução da resistência de união à dentina afetada ao longo do tempo, com $24h > 6m > 12m$ ($24h > 6m p < 0,001$; $24h > 12m p < 0,001$; $6m > 12m p=0,001$). Para o laser Er:YAG houve redução significativa apenas nos primeiros 6 meses de armazenamento em água $24h > 6m = 12m$ ($24h > 6m p<0,001$; $24h > 12m p<0,001$; $6m = 12m p=0,498$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios de resistência de união à microtração (em MPa) e desvios padrão para a interação dos fatores método vs tempo (n=10).

Método de remoção	Tempo de armazenamento		
	24 horas	6 meses	12 meses
Broca	17,17 (3,34) A,a	7,99 (4,15) A,b	4,12 (2,23) A,c
Laser Er:YAG	13,17 (1,76) B,a	7,26 (1,88) A,b	6,22 (2,78) B,b

Letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre métodos (linhas).

Letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística entre tempos (colunas).

ANOVA-três fatores, Bonferroni, $p > 0,05$.

A interação entre a biomodificação vs tempo foi significativa. Após 24h de armazenamento, não houve diferença entre os grupos biomodificados com quitosana ou não ($p=0,241$). A dentina biomodificada com quitosana apresentou maiores valores de μ TBS após 6 meses (com qui $>$ sem qui $p=0,011$) e após 12 meses (com qui $>$ sem qui $p < 0,001$) de armazenamento. Ao comparar os tempos para cada tratamento, verificou-se que os grupos biomodificados com quitosana apresentaram redução significativa da resistência de união a dentina afetada apenas nos primeiros 6 meses $24h > 6m = 12m$ ($24h > 6m p<0,001$; $24h >$

12m $p < 0,001$; 6m=12m $p = 0,155$). O grupo sem biomodificação apresentou redução ao longo do tempo, com 24h > 6m > 12m (24h > 6m $p < 0,001$; 24h > 12m $p < 0,001$; 6m > 12m $p = 0,003$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios de resistência de união à microtração (em MPa) e desvios padrão para a interação dos fatores biomodificação vs tempo.

Condição da dentina	Tempo de armazenamento		
	24h	6m	12m
Sem quitosana	14,67 (3,17) A,a	6,40 (2,18) B,b	3,76 (1,13) B,c
Quitosana	15,68 (3,47) A,a	8,86 (3,61) A,b	7,36 (2,35) A,b

Letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre condição da dentina (linha).

Letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística entre tempos (coluna).

ANOVA-três fatores, Bonferroni, $p > 0,05$.

A porcentagem de distribuição do tipo de falha obtido após o ensaio de resistência de união à microtração está ilustrada na Figura 10. A falha adesiva foi o tipo de falha mais prevalente para os palitos submetidos a 24 h, 6 meses e 12 meses de armazenamento em água.

Figura 10 - Gráfico de barras da porcentagem de distribuição do tipo de falha.

Por meio de análise morfológica da interface adesiva, a influência do tempo de armazenamento dos espécimes foi avaliada. Após 24 horas de armazenamento de água, os

achados morfológicos demonstraram que o laser de Er: YAG propiciou a formação de interfaces adesivas regulares e formação uniforme de *tags* resinosos em comparação com a broca, independentemente da biomodificação com quitosana. Além disso, numerosos *tags* resinosos foram observados para todos os grupos. Após 6 meses, a interface adesiva manteve-se preservada, no entanto, pequenos *gaps* foram encontrados para os grupos broca, broca e quitosana e para o laser de Er:YAG. Após 12 meses, as interfaces adesivas apresentaram *gaps*, especialmente os grupos sem biomodificação (broca e laser de Er:YAG) (Figura 11).

Figura 11 - Fotomicrografias da interface adesiva após remoção seletiva da lesão de cárie com broca ou laser de Er:YAG, com ou sem biomodificação com quitosana após 24 horas, 6 meses ou 12 meses de armazenamento de água. R = resina. A = adesivo. D = dentina remanescente afetada pela cárie. ➡ Indica a presença de *gaps*. ► Indica a presença de *tags* resinosos. ≧ Indica *microtags* laterais. Imagens em aumento de 1.500×.

A Figura 12 A mostra a porcentagem de redução da massa seca (mg) dos palitos de dentina armazenados em saliva artificial durante 7 dias. A remoção seletiva com laser de Er:YAG ($p > 0,664$) e a biomodificação com quitosana ($p > 0,263$) não influenciaram na perda de massa seca da dentina. Na comparação entre os grupos não foram encontradas diferenças ($p > 0,448$).

A concentração média de HYP na saliva artificial está ilustrada na Figura 12 B. A concentração de HYP não foi influenciada pela remoção da lesão de cárie com broca ou laser de Er:YAG ($p > 0,6347$). A biomodificação com quitosana não foi capaz de reduzir a liberação de HYP pela dentina desmineralizada ($p > 0,4274$). Na comparação entre os grupos não foram encontradas diferenças ($p > 0,765$).

Figura 12 – A. Redução da massa seca de palitos de dentina após 7 dias de armazenamento. B. Concentração de HYP na saliva artificial. O colágeno solubilizado de palitos de dentina desmineralizada foi expresso em µg de HYP / mg da massa seca inicial da dentina desmineralizada ($n = 7$).

Após a avaliação da perda de peso e da concentração de HYP, os palitos de dentina foram analisados por meio de MEV. As imagens revelaram que a remoção seletiva da lesão de cárie com broca em baixa rotação promoveu uma superfície de dentina completamente desmineralizada, com fibras de colágeno expostas. A biomodificação com quitosana propiciou uma superfície lisa sem colágeno exposto, possivelmente devido à deposição de partículas de quitosana sobre a superfície dentinária e dentro dos túbulos. Após a remoção seletiva da dentina cariada com laser de Er: YAG encontrou-se uma camada de matriz orgânica modificada, com os orifícios de abertura dos túbulos visíveis. A biomodificação com quitosana sobre a dentina irradiada com laser de Er:YAG promoveu uma superfície irregular

com uma camada de matriz orgânica modificada recobrindo dentina, porém com a maior parte dos túbulos abertos (Figura 13).

Figura 13 - Fotomicrografias de palitos de dentina após remoção seletiva da lesão de cárie, desmineralização, biomodificação com quitosana e armazenamento por 7 dias em saliva artificial. Remoção seletiva da lesão de cárie com broca: A. sem biomodificação e B. após biomodificação com quitosana. Remoção seletiva da lesão de cárie com laser de Er: YAG: C. sem biomodificação e D. após biomodificação com quitosana. Imagens em aumento de 10.000×.

Discussão

5. DISCUSSÃO

De acordo com o conceito de mínima intervenção, a dentina afetada deve ser preservada (KIDD et al., 2004), no entanto, sabe-se que a dentina remanescente após a remoção da lesão de cárie apresenta menor microdureza quando comparada a dentina hígida (SAKOOLNAMARKA et al., 2005). A microdureza da dentina depende da quantidade de matriz calcificada por mm^2 (PASHLEY et al., 1985), assim, as endentações foram realizadas na subsuperfície da dentina afetada por cárie como medida indireta de perda ou ganho mineral (ARENDS et al., 1992).

Com relação aos resultados obtidos no experimento 1, a remoção da lesão de cárie com laser de Er:YAG aumentou a microdureza da dentina residual afetada por cárie em comparação a broca em baixa rotação. O aumento no valor da microdureza está relacionado com aumento na dureza da dentina intertubular (KINNEY et al., 1996). O laser de Er:YAG ($2.94 \mu\text{m}$) é absorvido principalmente pela água e outros componentes orgânicos presentes no tecido dentinário. O teor de água na dentina intertubular é maior do que na dentina peritubular, o que é responsável pela ablação da dentina intertubular de forma mais seletiva por este comprimento de onda (HIBST et al., 1989; ARANHA et al., 2007).

Outros fatores importantes a serem considerados são os parâmetros utilizados neste estudo. A energia (250 mJ) e a frequência (4 Hz) estão diretamente relacionadas a capacidade de ablação do laser (CORONA et al., 2007). Estudos prévios demonstraram que a irradiação com laser de Er:YAG com frequência de 4 Hz apresentou eficácia semelhante a remoção de tecido cariado com broca em baixa rotação (FURTADO MESSIAS et al., 2006). A remoção seletiva com broca e laser de Er:YAG em modo não contato não diferiu em relação à quantidade de dentina remanescente encontrada no fundo da cavidade (KATIRCI ET AL., 2016). Além disso, outro estudo revelou que os maiores valores de microdureza foram encontrados após uso do laser de Er:YAG com 250 mJ/4 Hz e 350 mJ/4 Hz. Isso ocorre principalmente devido à frequência utilizada que leva a um maior número de micro explosões em um mesmo intervalo de tempo, tornando maior a interação do laser com o tecido irradiado (SOUZA-GABRIEL et al., 2009).

Em contraste aos resultados deste obtidos neste estudo, o valor de microdureza da dentina afetada após a remoção seletiva com laser de Er: YAG foi semelhante ao valor encontrado para broca em baixa rotação (KATIRCI et al., 2016). As endentações foram realizadas sobre a parede de fundo da cavidade (superfície). No presente estudo, as

endentações de microdureza foram realizadas na subsuperfície dentinária, pois não foi possível obter endentações precisas na superfície da dentina afetada pela cárie.

Outro estudo demonstrou que o preparo da cavidade com o laser de Er: YAG não influenciou na microdureza da dentina adjacente a restauração de resina composta submetida a desafio cariogênico *in situ*, no entanto, neste estudo, a dentina desmineralizada foi totalmente removida durante o preparo da cavidade (CHINELATTI et al., 2017). Comparações diretas com os resultados deste estudo tornam-se dificultadas uma vez que a literatura é escassa a respeito dos efeitos provocados pela ablação com laser de Er:YAG sobre a microdureza da dentina afetada por cárie.

Considerando a possibilidade de incorporar a quitosana na dentina, a biomodificação com este biopolímero foi realizada na dentina residual afetada por cárie, a fim de possibilitar a remineralização e fortalecimento da matriz de colágeno (XU et al., 2011). No entanto, de acordo com nossos resultados, o gel de quitosana a 2,5% não alterou a microdureza da subsuperfície dentinária.

No presente estudo, a quantidade de cálcio, fósforo e relação cálcio/fósforo presente nos cristais de hidroxiapatita que constituem a estrutura inorgânica da dentina foram determinadas por análise em EDS. O laser de Er: YAG alterou a composição química da dentina afetada por cárie, promovendo uma redução da proporção de cálcio, fósforo e da relação cálcio / fósforo após a remoção da lesão de cárie.

Alterações na relação cálcio/fósforo indicam que a relação original entre os componentes orgânicos e inorgânicos foi alterada. Isso pode afetar a permeabilidade, a solubilidade e/ou o padrão adesivo dos tecidos dentais duros. Os sistemas adesivos se ligam ao cálcio presente na hidroxiapatita da dentina, assim alterações nas quantidades de íons cálcio ou na relação cálcio/fósforo podem interferir negativamente no processo de adesão dos materiais restauradores (ROHANIZADEH et al., 1999).

Sabe-se que a irradiação a laser pode promover alterações microestruturais, micro-rupturas e desnaturação das fibras colágenas (ARANHA et al., 2007). A composição química, ou seja, os componentes inorgânicos da dentina não foram afetados pela quitosana. O uso de um agente biomodificador pode ser mais importante para a porção orgânica da dentina, que é predominantemente composta de colágeno tipo I (MARSHALL et al., 1997). Em meio ácido, os grupos amino da molécula de quitosana são capazes de capturar íons de hidrogênio, conferindo carga positiva a este composto (SEZER et al., 2008), o qual se liga facilmente a superfícies carregadas negativamente, tornando-se um composto bio-adesivo (JIANG et al., 2014; PERCHYONOK et al., 2014). O uso de um agente bioativo, que permite a

biomodificação da dentina pode promover melhores condições para uma união adequada dos materiais restauradores à dentina, proporcionando uma estabilidade da interface adesiva em longo prazo.

A análise em MEV demonstrou que os métodos utilizados para remoção de cárie promoveram alterações morfológicas na dentina afetada por cárie. O laser de Er:YAG promoveu uma superfície irregular com uma camada de matriz orgânica modificada em comparação com broca em baixa rotação (Figura 9). Ambos os métodos promoveram a abertura dos orifícios dos túbulos dentinários. Esses achados são contrários aos observados por RAUCCI-NETO et al. (2015), que após uso do laser de Er:YAG encontrou *smear layer* obliterando os túbulos dentinários. No entanto, neste estudo, foram utilizadas frequências mais altas e menor fluxo de água, o que pode ter promovido diferentes achados morfológicos. Outro estudo demonstrou que o laser de Er:YAG para a preparo de cavidades promoveu uma superfície de dentina desmineralizada sem *smear layer* e com túbulos dentinários expostos (MELO et al., 2015). Porém, neste estudo, não houve preocupação em manter a dentina afetada pela cárie, sendo a lesão cariosa totalmente removida.

A biomodificação com quitosana na superfície irradiada com laser promoveu uma superfície irregular com uma camada de matriz orgânica modificada recobrando a dentina, derretimento e a maior parte dos túbulos dentinários abertos (Figura 9). Quando a broca em baixa rotação foi utilizada, encontrou-se uma superfície recoberta com *smear layer*, porém com túbulos dentinários abertos (Figura 9). Outros estudos investigaram o uso de quitosana nas estruturas dentárias (XU et al., 2011; ARNAUD et al., 2010). ARNAUD et al. (2010) e demonstraram que a quitosana é capaz de reduzir a desmineralização do esmalte dentário, inibindo a liberação de fósforo; e por meio de Tomografia de Coerência Óptica verificaram que a quitosana atua como uma barreira contra a penetração de ácidos. XU et al. (2011) também observaram partículas de quitosana depositadas na superfície, obliterando parcialmente os túbulos dentinários. De acordo com os autores, esse fato pode ser relevante para o tratamento da lesão de cárie e hipersensibilidade dentinária.

Com relação aos resultados obtidos no experimento 2, a resistência de união à dentina afetada apresentou redução ao longo do tempo, independente do método de remoção utilizado. Quando comparada à dentina hígida, a dentina afetada por cárie apresenta características químicas e morfológicas distintas. Há uma maior exposição das fibras colágenas devido à perda do componente mineral da dentina intertubular (NISHITANI et al., 2005), o que pode ser uma das razões para a menor força adesiva (ARRAIS et al., 2004). Neste sentido, a remoção seletiva da lesão de cárie utilizando laser de Er:YAG foi realizada

neste estudo, a fim de preservar a dentina afetada uma vez que este sistema possui alta afinidade por água e pela hidroxiapatita (PAGHDIWALA, 1991), permitindo a remoção de tecido duro com alta precisão.

Não há consenso na literatura se o uso do laser de Er:YAG poderia aumentar a resistência de união do material restaurador à dentina, especialmente à dentina afetada por cárie (SATTABANASUK et al., 2006; CEBALLOS et al., 2002; HE et al., 2009). Enquanto estudos demonstram que o uso do laser de Er:YAG não influencia negativamente na resistência de união à dentina (SATTABANASUK et al., 2006; CEBE et al., 2017), a presença de uma camada de matriz orgânica modificada por laser é considerada o principal motivo para a redução da resistência de união (CEBALLOS et al., 2002; HE et al., 2009).

Os resultados do presente estudo demonstraram baixos valores de resistência de união após a remoção seletiva da lesão de cárie com laser de Er:YAG para o período de 24 horas. No entanto, após 6 meses de armazenamento, os métodos não apresentaram diferenças entre si e após 12 meses, a dentina irradiada manteve seus valores de resistência de união, enquanto a broca apresentou redução contínua.

Durante a irradiação, o conteúdo de água presente nas fibrilas de colágeno é absorvido pela energia do laser (CEBALLOS et al., 2002) o que irá ocasionar alteração no conteúdo de colágeno e desnaturação das fibrilas em profundidade de até 5 a 10 μm (HE et al., 2009). Isso reduz o espaço fibrilar, restringindo a difusão do material restaurador à subsuperfície de dentina (CEBALLOS et al., 2002; HE et al., 2017), ou seja, a improvável hibridização deste substrato (CEBALLOS et al., 2002) poderia explicar a redução da resistência de união a dentina irradiada encontrada por estudos prévios (AMARAL et al., 2008; HE et al., 2009; SCHEIN et al., 2003).

Após a irradiação com laser de Er:YAG há ausência de *smear layer* (CEBALLOS et al., 2008) e a união à dentina ocorre devido a um padrão microrretentivo gerado pela ablação do substrato e pela formação de *tags* resinosos formados nos túbulos dentinários abertos (GISLER;GUTKNECHT, 2014)

No presente estudo, diferentemente dos grupos tratados com broca, a dentina irradiada manteve seus valores de resistência de união após 12 meses de armazenamento em água. As alterações produzidas pelo laser poderiam tornar a superfície de dentina mais resistente a desmineralização em longo prazo (GALAFASSI et al., 2017). No entanto, comparações diretas com os resultados deste estudo tornam-se dificultadas devido há escassez de estudos que avaliaram a resistência de união à dentina afetada irradiada com laser de Er:YAG após 12 meses de armazenamento ou mais.

Independente do método de remoção utilizado, a biomodificação com quitosana promoveu maior resistência de união à dentina residual após 6 meses de armazenamento, e esses valores foram mantidos após 12 meses, o que não ocorreu para os grupos sem biomodificação, que apresentaram redução contínua ao longo do tempo.

A quitosana possui propriedades como grupos reativos livres e similaridade com os componentes da matriz extracelular tais como glicosaminoglicanos (GAGs) (TARAVEL et al., 1993). A interação entre a quitosana e o colágeno (dois polímeros especificamente carregados) resultou em um complexo insolúvel contendo ambos os polímeros (KISHEN et al., 2016), o que pode ter aumentado a estabilidade da interface resina/dentina neste estudo.

As fotomicrografias da interface resina/dentina mostraram que a biomodificação com quitosana preservou a interface após 12 meses de armazenamento em água (Figura 11). Esses achados estão de acordo com outros estudos que avaliaram o uso de quitosana para melhorar a união da interface adesiva. O uso de quitosana possibilitou melhor vedação e prolongou a durabilidade da restauração no dente desmineralizado (DIOLOSA et al., 2014).

A degradação da interface adesiva pode iniciar-se durante os procedimentos restauradores, pois as fibras de colágeno podem permanecer parcialmente desprotegidas devido à penetração e conversão incompletas dos monômeros resinosos (HEBLING et al., 2005, MAZZONI et al., 2006). No presente estudo, a avaliação da perda de massa seca e a hidroxiprolina liberada da matriz desmineralizada foram utilizadas a fim de esclarecer se a quitosana seria capaz incorporar-se a dentina e inativar a atividade de collagenases endógenas. No entanto, a massa seca e a liberação de hidroxiprolina não foram alteradas nos grupos tratados com quitosana em comparação aos não tratados.

Sabe-se que o colágeno é o principal componente orgânico da dentina (MJOR, 1973). Esta proteína fibrilar é formada por um filamento de tripla hélice com três cadeias polipeptídicas compostas por vários aminoácidos, dentre eles a glicina, a prolina e a hidroxiprolina. A degradação do colágeno só é possível após a clivagem da tripla hélice pelas enzimas collagenolíticas (VAN STRIJP et al., 2003). As fotomicrografias dos palitos de dentina mostraram que a quitosana permaneceu depositada sobre a superfície de dentina desmineralizada após 7 dias de armazenamento (Figura 13), sendo, aparentemente, não incorporada na matriz dentinária, o que poderia explicar por que não houve alteração na massa seca da dentina e na atividade collagenolítica das MMPs.

Outro fato importante a ser considerado é que durante as análises da massa seca e da liberação de hidroxiprolina, os palitos desmineralizados foram condicionados com ácido fosfórico e biomodificação com quitosana foi realizada. Há relatos de que as enzimas

endógenas presentes na dentina podem ser previamente inativadas por ácido fosfórico, e posteriormente podem se reativar devido o uso do sistema adesivo (*etch-and-rinse*) (MAZZONI et al., 2006). A aplicação do sistema adesivo não foi realizada nestas análises, uma vez que estes palitos não foram restaurados, diferentemente dos palitos destinados à análise de microtração. Esta poderia ser uma das razões pela qual a quitosana não influenciou na liberação de hidroxiprolina, porém preservou a resistência de união da resina à dentina após o armazenamento em longo prazo.

O laser de Er:YAG proporcionou aumento da microdureza da subsuperfície e manutenção da resistência de união à dentina afetada após armazenamento em longo prazo. Além disso, a biomodificação da dentina residual com quitosana, independente do método de remoção utilizado, promoveu maiores valores de resistência de união e preservou a interface adesiva. Estudos futuros que avaliem os efeitos da dentina irradiada, bem como, modificações químicas a fim de tornar a quitosana ainda mais eficiente para ser utilizada nos substratos dentais são necessários.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- A remoção seletiva da dentina cariada com o laser de Er:YAG aumentou a microdureza da dentina residual afetada por cárie, alterando sua morfologia superficial e composição química. A biomodificação com quitosana não influenciou a composição estrutural e química da dentina afetada.
- Após 24h de armazenamento em água, a resistência de união da resina composta à dentina foi afetada pelo laser de Er:YAG. No entanto, a resistência de união à dentina irradiada foi mantida, enquanto a dentina tratada com broca apresentou redução contínua. A biomodificação com quitosana, independente do método de remoção utilizado, preservou a resistência de união e a interface adesiva ao longo de 12 meses. O laser de Er:YAG e a biomodificação com quitosana não influenciaram na perda de massa seca e na liberação de hidroxiprolina.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGGARWAL, V., SINGLA, M., SHARMA, R., MIGLANI, S., BHASIN, S. S. Effects of simplified ethanol-wet bonding technique on immediate bond strength with normal versus caries-affected dentin. **Journal of Conservative Dentistry**, v.19, n.5, p.419-423. 2016.
2. AMARAL, F. L. B., COLUCCI, V., SOUZA-GABRIEL, A. E., CHINELATTI, M. A., PALMA-DIBB R. G., CORONA, S. A. M. Adhesion to Er:YAG laser-prepared dentin after long-term water storage and thermocycling. **Operative Dentistry**, v.33, n.1, p.51-58. 2008.
3. ARANHA, A. C., DE PAULA EDUARDO, C., GUTKNECHT, N., MARQUES, M. M., RAMALHO, K. M., APEL, C. Analysis of the interfacial micromorphology of adhesive systems in cavities prepared with Er,Cr:YSGG, Er:YAG laser and bur. **Microscopy Research and Technique**, v.70, n.8, p.745-751. 2007.
4. ARENDS, J., TEN BOSCH, J. J. Demineralization and remineralization evaluation techniques. **Journal of Dental Research**, v.71, n., p.924-948. 1992.
5. ARNAUD, T. M., DE BARROS, NETO, B., DINIZ, F. B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. **Journal of Dentistry**, v.38, n.11, p.848-852. 2010.
6. ARRAIS, C. A., GIANNINI, M., NAKAJIMA, M., TAGAMI, J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. **European Journal of Oral Sciences**, v.112, n.5, p.458-464. 2004.
7. BANERJEE, A., KIDD, E. A., WATSON, T. F. In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. **Caries Research**, v.34, n.2, p.144–150. 2000.
8. CEBALLOS, L., TOLEDANO, M., OSORIO, R., TAY, F. R., MARSHALL, G. W. Bonding to Er-YAG-laser-treated dentin. **Journal of Dentistry Research**, v.81, n.2, p.119-122. 2002.
9. CELIK, E. U., ERGÜCÜ, Z., TÜRKÜN, L. S., TÜRKÜN, M. Shear bond strength of different adhesives to Er:YAG laser-prepared dentin. **Journal of Adhesive Dentistry**, v.8, n.5, p.319-325. 2006.
10. CHEN, Z., CAO, S., WANG, H., LI, Y., KISHEN, A., DENG, X., YANG, X., WANG, Y., CONG, C., WANG, H., ZHANG, X. Biomimetic remineralization of demineralized dentine using scaffold of CMC/ACP nanocomplexes in an in vitro tooth model of deep caries. **PLoS One**, v.10, n.1, e0116553. 2015.
11. CHINELATTI, M. A., ROCHA, C. T., COLUCCI, V., SERRA, M. C., RODRIGUES-JÚNIOR, A. L., CORONA, S. A. Effect of Er:YAG laser on dentin demineralization around restorations. **Lasers in Medical Science**, v.32, n.2, p.413-418. 2017.
12. CHUNG, J. H., KIM, Y. K., KIM, K. H., KWON, T. Y., VAEZMOMENI, S. Z., SAMIEI, M., AGHAZADEH, M., DAVARAN, S., MAHKAM, M., ASADI, G., AKBARZADEH, A. Synthesis, characterization, biocompatibility of hydroxyapatite-natural polymers nanocomposites for dentistry applications. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v.44, n.1, p.277-284. 2016.
13. CORONA, S. A. M., SOUZA, A. E., CHINELATTI, M. A., PECORA, J. D., BORSATTO, M. C., PALMA DIBB, R. G. Effect of energy and pulse repetition rate of Er:YAG laser on

- dentin ablation ability and morphological analysis of the laser irradiated substrate. **Photomedicine Laser & Surgery**, v.25, n.1, p.26-36. 2007.
14. CURYLOFO-ZOTTI, F. A., TANTA, G. S., ZUCOLOTO, M. L., SOUZA-GABRIEL, A. E., CORONA, S. A. M. Selective removal of carious lesion with Er:YAG laser followed by dentin biomodification with chitosan. **Lasers in Medical Science**, *in press*. 2017.
 15. DE MENEZES M, TURSSI CP, FARAONI-ROMANO JJ, SERRA MC. Susceptibility of bleached enamel and root dentin to artificially formed caries-like lesions. **American Journal of Dentistry**, v.20, n.3, p.173-176. 2007.
 16. DIOLOSÀ, M., DONATI, I., TURCO, G., CADENARO, M., DI LENARDA, R., BRESCHI, L, PAOLETTI, S. Use of methacrylate modified chitosan to increase the durability of dentine bonding systems. **Biomacromolecules**, v.15, n.12, p.4606-4613. 2014.
 17. DOMARD A. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.84, n.2, p.696-703. 2011.
 18. ELSAKA, S., ELNAGHY, A. Effect of addition of chitosan to self-etching primer: antibacterial activity and push-out bond strength to radicular dentin. **Journal of Biomedical Research**, v.26, n.4, p.288-294. 2012.
 19. FERREIRA, L. S., APEL, C., FRANCCI, C., SIMOES, A., EDUARDO, C. P., GUTKNECHT, N. Influence of etching time on bond strength in dentin irradiated with erbium lasers. **Lasers in Medical Science**, v.25, n.6, p.849-854. 2010.
 20. FORNAINI, C., RICEPUTI, D., LUPI-PEGURIER, L., ROCCA, J. P. Patient responses to Er:YAG laser when used for conservative Dentistry. **Lasers in Medical Science**, v.27, n.6, p.1143–1149. 2012.
 21. FURTADO MESSIAS, D. C., SOUZA-GABRIEL, A. E., PALMA-DIBB, R. G., RODRIGUES JR, A. L., SERRA, M. C. Efficiency and effectiveness of Er:YAG laser on carious tissue removal. **The Journal of Oral Laser Applications**, v.6, n.3, p.181-186. 2006.
 22. FUSAYAMA, T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. **Operative Dentistry**, v.4, n.2, p.63-70. 1979.
 23. GISLER, G., GUTKNECHT N. The influence of the energy density and other clinical parameters on bond strength to Er:YAG conditioned dentin compared to conventional dentin adhesion. **Lasers in Medical Science**, v.29, n.1, p.77-84, 2014.
 24. HARA, A. T., ANDO, M., GONZALEZ-GABEZA, C., CURY, J. A., SERRA, M. C., ZERO D. T. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. **Journal of Dental Research**, v.85, n.7, p.612-216. 2006.
 25. HARA, A. T., QUEIROZ, C. S., PAES LEME, A. F., SERRA, M. C., CURY, J. A. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentin in situ. **Caries Research**, v.37, n.5, p.339-344. 2003.
 26. HE, Z., CHEN, L., HU, X., SHIMADA, Y., OTSUKI, M., TAGAMI, J., RUAN, S. Mechanical properties and molecular structure analysis of subsurface dentin after Er:YAG laser irradiation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v.74, n., p.274-282. 2017.

27. HE, Z., OTSUKI M., SADR A., TAGAMI J. Acid resistance of dentin after erbium: yttrium-aluminum-garnet laser irradiation. **Lasers in Medical Sciences**, v.24, n.4, p. 507-513. 2009.
28. HEBLING, J., PASHLEY, D. H., TJÄDERHANE, L., TAY, F. R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **Journal of Dental Research**, v.84, n.8, p.741-746. 2005.
29. HIBST, R., KELLER, U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.9, n.4, p.338-340. 1989.
30. JIANG, T., JAMES, R., KUMBAR, S. G., LAURENCIN, C. T. Chitosan as a biomaterial: Structure, properties, and applications in tissue engineering and drug delivery. In: Kumbar, S. G., Laurencin, C. T., Deng, M (Ed) **Natural and synthetic biomedical polymers**. Burlington: Elsevier, 2014. p. 91-113.
31. KATIRCI, G., ERMIS, R. B. Microindentation hardness and calcium/phosphorus ratio of dentin following excavation of dental caries lesions with different techniques. **Springerplus**, v.5, n.1, p.1641. 2016.
32. KIDD EA. How clean must a cavity be before restoration? **Caries Research**, v.38, n.3, p.305-313. 2004.
33. KINNEY, J. H., BALOOCH, M., MARSHALL, S. J., MARSHALL, G. W. JR., WEIHS, T. P. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. **Archives of Oral Biology**, v.41, n.1, p.9-13. 1996.
34. KIRZIOGLU, Z., GURBUZ, T., YILMAZ, Y. Clinical evaluation of chemomechanical and mechanical caries removal: status of the restorations at 3, 6, 9 and 12 months. **Clinical Oral Investigations**, v.11, n.1, p.69-76. 2007.
35. KISHEN, A., SHRESTHA, S., SHRESTHA, A., CHENG C, GOH, C. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. **Dental Materials**, v.32, n.8, p.968-977. 2016.
36. LONGHI, M., CERRONI, L., CONDÒ, S. G., ARIANO, V., PASQUANTONIO, G. The effects of host derived metalloproteinases on dentin bond and the role of MMPs inhibitors on dentin matrix degradation. **ORAL & Implantology (Rome)**, v.7, n.3, p.71-79. 2015.
37. MARQUEZAN, M., CORRÊA, F. N., SANABE, M. E., RODRIGUES FILHO, L. E., HEBLING, J., GUEDES-PINTO, A. C., MENDES, F. M. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. **Archives of Oral Biology**, V.54, n.12, p.1111-1117. 2009.
38. MARSHALL, G. W., JR., MARSHALL, S. J., KINNEY, J. H., BALOOCH, M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **Journal of Dentistry**, v.25, n.6, p.441-458. 1997.
39. MAZZONI, A., PASHLEY, D. H., NISHITANI, Y., BRESCHI, L., MANNELLO, F., TJÄDERHANE, L., TOLEDANO, M., PASHLEY, E. L., TA, F. R. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. **Biomaterials**, v.27, n.25, p.4470-4476. 2006.

40. MELO, M. A., LIMA, J. P., PASSOS, V. F., RODRIGUES, L. K. The influence of dentin demineralization on morphological features of cavities using Er:YAG laser. **Photomedicine & Laser Surgery**, v.33, n.1, p.22-28. 2015.
41. MERIGO, E., FORNAINI, C., CLINI, F., FONTANA, M., CELLA, L., OPPICI, A. Er:YAG laser dentistry in special needs patients. **Laser Therapy**, v.24, n.3, p.189-193. 2015.
42. MJÖR, I. A., HOLST, D., ERIKSEN, H. M. Caries and restoration prevention. **Journal of American Dental Association**, v.139, n.5, p.565-570. 2008.
43. MOOSAVI, H., GHORBANZADEH, S., AHRARI, F. Structural and morphological changes in human dentin after ablative and subablative Er:YAG laser irradiation. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v.7, n.2, p.86-91. 2016.
44. MUZZARELLI, R. Chitosan. In: Muzzarelli, R. **Natural Chelating Polymers**. Pergamon Press: Oxford, 1973. p. 144–176.
45. NAKAJIMA, M., KUNAWAROTE, S., PRASANSUTTIPORN, T., TAGAMI, J. Bonding to caries-affected dentin. **Japanese Dental Science Review**, v.47, n.2, p.102-114. 2011.
46. NICOLOSO, G. F., ANTONIAZZI, B. F., LENZI, T. L., SOARES, F. Z. M., ROCHA, R. O. The bonding performance of an universal adhesive to artificially-created caries-affected dentin. **Journal of Adhesive Dentistry**, v.19, n.4, p.317-321. 2017.
47. NISHITANI, Y., YOSHIYAMA, M., TAY, F. R., WADGAONKAR, B., WALLER, J., AGEE, K., PASHLEY, D., H. Tensile strength of mineralized/demineralized human normal and carious dentin. **Journal of Dental Research**, v.84, n.11, p.1075-1078. 2005.
48. PAGHDIWALA, A. F. Does the laser work on hard dental tissue? **JADA**, v.122, n.1, p.79-80. 1991
49. PASHLEY, D., OKABE, A., PARHAM, P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. **Endodontics & Dental Traumatology**, v.1, n.5, p.176-179. 1985.
50. PERCHYONOK, V. T., GROBLER, S. R., ZHANG, S. IPNs from cyclodextrin: chitosan antioxidants: bonding, bio-Adhesion, antioxidant capacity and drug release. **Journal of Functional Biomaterials**, v.5, n.3, p.183-96. 2014.
51. PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Journal of Macromolecular Science Part A**, v.32, n.4, p.629-640. 1995.
52. PROFETA, A. C., MANNOCCI, F., FOXTON, R. M., THOMPSON, I., WATSON, T. F., SAURO, S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin–dentine interface: a microtensile bond strength, scanning electron and confocal microscopy study. **European Journal of Oral Sciences**, v.120, n.4, p.353–362. 2012.
53. RAAFAT, D., SAHL, H. G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. **Microbial Biotechnology**, v.2, n.2, p.186–201. 2009.
54. RABEA, E. I., BADAWY, M. E., STEVENS, C. V., SMAGGHE, G., STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v.4, n.6, p.1457-1465. 2003.

55. RAUCCI-NETO, W., RAQUEL DOS SANTOS, C., AUGUSTO DE LIMA, F., PECORA, J. D., BACHMANN, L., PALMA-DIBB, R. G. Thermal effects and morphological aspects of varying Er:YAG laser energy on demineralized dentin removal: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v.30, n.4, p.1231-1236. 2015.
56. RICKETTS, D. N., KIDD, E. A., INNES, N., CLARKSON, J. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.3, CD003808. 2006.
57. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, n.7, p.603–632. 2006.
58. ROHANIZADEH, R., LEGEROS, R. Z., FAN, D., JEAN, A., DACULSI, G. Ultrastructural properties of laser-irradiated and heat-treated dentin. **Journal of Dental Research**, v.78, n.12, p.1829-1835. 1999.
59. SAKOOLNAMARKA, R., BURROW, M. F., SWAIN, M., TYAS, M. J. Microhardness and Ca:P ratio of carious and Carisolv treated caries-dentine using an ultra-micro indentation system energy dispersive analysis of x-rays—a pilot study. **Australian Dental Journal**, v.50, n.4, p.246-250. 2005.
60. SANO, H., SHIBASAKI, K., MATSUKUBO, T., TAKAESU, Y. Effect of rinsing with phosphorylated chitosan on four-day plaque regrowth. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v.42, n.4, p.251-256. 2001.
61. SASAKI, K. M., AOKI, A., MASUNO, H., ICHINOSE, S., YAMADA, S., ISHIKAWA, I. Compositional analysis of root cementum and dentin after Er:YAG laser irradiation compared with CO₂ lased and intact roots using Fourier transformed infrared spectroscopy. **Journal of Periodontal Research**, v.37, n.1, p.50-59. 2002.
62. SATTABANASUK, V., BURROW, M. F., SHIMADA, Y., TAGAMI, J. Resin adhesion to caries-affected dentine after different removal methods. **Australian Dental Journal**, v.51, n.2, p.162-169. 2006.
63. SCHEIN, M.T., BOCANGEL, J. S., NOGUEIRA, G. E. C., SCHEIN, P. A. L. SEM evaluation of interaction pattern dentin and resin after cavity preparation using Er:YAG laser. **Journal of Dentistry**, v.31, n.2, p.127-135. 2003.
64. SCHOLTANUS, H., PURWANTA, K., DOGAN, N., KLEVERLAAN, C. J., FEILZER, A. J. Microtensile bond strength of three simplified adhesive systems to caries-affected dentin. **Journal of Adhesive Dentistry**, v.12, n.4, p.273-278. 2010.
65. SCHWASS, D. R., LEICHTER, J. W., PURTON, D. G., SWAIN, M. V. Evaluating the efficiency of caries removal using an Er:YAG laser driven by fluorescence feedback control. **Archives of Oral Biology**, v.58, n.6, p.603-610. 2013.
66. SCHWENDICKE, F., FRENCKEN, J. E., BJØRNDAL, L., MALTZ, M., MANTON, D. J., RICKETTS, D., VAN LANDUYT, K., BANERJEE, A., CAMPUS, G., DOMÉJEAN, S., FONTANA, M., LEAL, S., LO, E., MACHIULSKIENE, V., SCHULTE, A., SPLIETH, C., ZANDONA, A. F., INNES, N. P. Managing carious lesions: consensus recommendations on carious tissue removal. **Advances in Dental Research**, v.28, n.2, p.58-67. 2016.

67. SEZER, A. D., CEVHER, E., HATİPOĞLU, F., OGURTAN, Z., BAS, A. L., AKBUGA, J. Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.12, p.2326-2333. 2008.
68. SILVA, P. V., GUEDES, D. F., PECORA, J. D., CRUZ-FILHO, A. M. Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. **Brazilian Dental Journal**, v.23, n.4, p.357-361. 2012.
69. SOUZA-GABRIEL, A. E., CHINELATTI, M. A., PECORA, J. D., PALMA-DIBB, R. G., CORONA, A. S. Dentin microhardness and subsurface morphology after Er:YAG laser cavity preparation using different parameters. **Journal of Dentistry for Children**, v.76, n.1, p.58-66. 2009.
70. TAKEDA, F. H., HARASHIMA, T., KIMURA, Y., MATSUMOTO, K. Comparative study about the removal of smear layer by three types of laser devices. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v.16, n.2, p.117-122. 1998.
71. TANBOGA, I., EREN, F., ALTINOK, B., PEKER, S., ERTUGRAL, F. The effect of low level laser therapy on pain during dental tooth-cavity preparation in children. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v.12, n.2, p.93-95. 2011.
72. TARAVEL, M. N., DOMARD, A. Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interactions with chitosan: I. **Biomaterials**, v.14, n.12, p.930-938. 1993.
73. THOMPSON, V., CRAIG, R. G., CURRO, F. A., GREEN, W. S., SHIP, J. A. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: a critical review. **The Journal of the American Dental Association**, v.139, n.6, p.705-712. 2008.
74. TJADERHANE, L., LARJAVA, H., SORSA, T., UITTO, V. J., LARMAS, M., SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **Journal of Dental Research**, v.77, n.8, p.1622-629. 1998.
75. VALERIO, R. A., BORSATTO, M. C., SERRA, M. C., POLIZELI, S. A., NEMEZIO, M. A., GALO, R., AIRES, C. P., DOS SANTOS, A. C., CORONA, S. A. Caries removal in deciduous teeth using an Er:YAG laser: a randomized split-mouth clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n.1, p.65-73. 2016.
76. VAN STRIJP, A. J., JANSEN, D. C., DEGROOT, J., TEN CATE, J. M., EVERTS, V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. **Caries Research**, v.37, n.1, p.58-65. 2003.
77. WALSH, L. J., BROSTEK, A. M. Minimum intervention dentistry principles and objectives. **Australian Dental Journal**, v.58, n.1, p.3-16. 2013.
78. XU, Z., NEOH, K. G., LIN, C. C., KISHEN, A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentin modified with phosphorylated chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.98, n.1, p.150-159. 2011.
79. XU, Z., NEOH, K. G., LIN, C. C., KISHEN, A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.98, n.1, p.150-159. 2011.
80. ZHEGOVA, G., RASHKOVA, M., ROCCA, J. P. Minimally invasive treatment of dental caries in primary teeth using an Er:YAG Laser. **Laser Therapy**, v.23, n.4, p.249-254. 2014.