UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TATIANA CARVALHO MONTES

**Efeito de solução experimental de quitosana com extratos naturais
nas propriedades físicas, morfológicas e adesivas da dentina
radicular.**

RIBEIRÃO PRETO

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito de solução experimental de quitosana com extratos naturais nas propriedades físicas, morfológicas e adesivas da dentina radicular.

Tatiana Carvalho Montes

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Programa: Odontologia Restauradora – Área de Concentração: Odontologia Restauradora - Opção: Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca

Montes, Tatiana Carvalho.

Efeito de solução experimental de quitosana com extratos naturais nas propriedades físicas, morfológicas e adesivas da dentina radicular. Ribeirão Preto, 2018.

83 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2018.

Orientadora: Profa: Dra. Regina Guenka Palma-Dibb.

1. Hipersensibilidade dentinária. 2. Erosão dentinária. 3. Dessensibilizantes. 4. Permeabilidade dentinária. 5. Dentina radicular.

CARVALHO, T. C. Efeito de solução experimental de quitosana com extratos naturais nas propriedades físicas, morfológicas e adesivas da dentina radicular. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Data da Defesa: _____

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: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Maria de Lourdes Carvalho** e à minha irmã **Jéssica**, pelo apoio e amor incondicional. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, me incentivando e me lembrando de que a família é o mais importante de tudo. Amo muito vocês.

Essa conquista é nossa!

Ao meu pai **João**, por torcer sempre pelas minhas conquistas.

Às minhas avós **Ruth** e **Sebastiana**, vocês são exemplos de mulheres fortes e grandes inspirações. Amo vocês!

À memória dos meus avôs **José Carvalho** e **Manoel Rochinha**, como queria que estivessem comigo nesse momento. Homens humildes, sábios e bondosos. Levarei os ensinamentos por toda a vida.

Ao meu padraсто **Jonas** e a todos os meus familiares, tios, tias e primos, por toda torcida e apoio.

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP**, representada pela digníssima diretora Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva e pelo Vice-Diretor Prof. Dr. Arthur Belem Novaes Júnior.

À **Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP**, na pessoa da Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, na pessoa do Prof, Dr. Manoel Damião de Souza Neto.

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

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo nº 2016/12786-7) pelo apoio e financiamento do trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**.

A **todos os funcionários e professores do departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Ao **secretário de pós-graduação**, Carlos Feitosa dos Santos, por toda disponibilidade e auxílio, sempre estando disposto a ajudar. Muito obrigada!

Aos **professores do programa de pós-graduação em Odontologia Restauradora**, pela disposição e por todos os conhecimentos transmitidos durante esses dois anos.

À química e técnica do Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, **Débora Fernandes Costa Guedes**. Muito obrigada pela parceria e auxílio na execução desse trabalho.

Aos **professores da Universidade Federal de Uberlândia**, em especial, Paulo Vinícius Soares, Karen Renata Nakamura Hiraki, Marcelo Caetano Parreira da Silva, Márcio Magno Costa, Rosana Ono, Roberto Bernardino Júnior, Fátima Ioko Mochidome, Jonas Dantas Batista, Rogério Moreira Arcieri, Luís Henrique Araújo Raposo, Ailton Amado (*In memoriam*), pelos ensinamentos transmitidos, pela construção do meu conhecimento e todo o apoio durante a graduação.

Aos **professores da Faepo de Araraquara**, Francisco Mollo Junior e Luiz Antônio Borelli Barros por todos os ensinamentos e aprendizados. Fica até mais fácil aprender prótese com vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

Agradeço com todas as minhas forças por tudo. A proteção, à minha família, à nossa saúde, às oportunidades que tive e por sempre caminhar ao meu lado. Obrigada pelo amparo que sempre me deu. Com certeza as horas difíceis foram bem menos difíceis por estar comigo. Obrigada sempre.

À minha professora orientadora, **Profª Drª Regina Guenka Palma Dibb** por acreditar em mim e no meu trabalho. Agradeço por toda a orientação, transmissão de conhecimentos e oportunidades. Obrigada por não medir esforços para me ajudar, estando sempre disposta, mesmo com tantos afazeres. Grande exemplo de profissional a qual irei me espelhar sempre. Obrigada por tudo!

À amiga e colaboradora, **Drª Juliana Jendiroba Faraoni** por todo o apoio e ajuda na execução do trabalho e por todas as palavras amigas nos momentos que precisei. Você é um exemplo de pessoa e profissional Ju. Obrigada!

Aos **amigos da pós-graduação**, Reinaldo, Júlia, Isabela, Laís e Raí, por todos os momentos de trabalho e descontração. Vocês fizeram os dias no laboratório muito mais divertidos.

Aos **amigos** Thaís, Daniel, Gabriela, Milagros e Shelyn por estarem sempre presentes e por tudo que passamos juntos durante esses dois anos. São amizades que levarei por toda a vida.

Às **minhas Lulus**, Iara (super amiga e parceirinha de clínica), Bruninha, Paula, Letícia, Monise, Thaís, Lara, Priscilla, pela amizade e companheirismo que começaram na graduação e até hoje tenho o privilégio de ter. Obrigada por se fazerem presentes, mesmo frente à distância e obrigada pela torcida e apoio. Amo vocês!

As **primas-irmãs**, Lexina, Valessa e Juliana e as mais que primas e amigas, Adriana e Júlia por estarem sempre presentes durante todos esses anos. Meninas, nem imagino como teria sido a vida sem vocês e obrigada por me darem a certeza que sempre terei com quem contar.

As **cirurgiãs-dentistas e professoras da família**, minha mãe Lourdinha, madrinha Luciana e tia Terezinha, me inspiro em vocês como exemplos de profissionais. Obrigada!!

Aos **colegas e amigos do grupo LCNC de Uberlândia**, Fabrícia, Analice, Alexandre, Andrea, Pedro, Guilherme, Marina, Paola, Daniela, Alexia, Livia, Igor, Soninha, Ramon, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Aprendi um pouco com cada um e levarei a amizade de vocês sempre comigo.

Ao **Prof. Dr. Paulo Vinícius Soares**, pela orientação durante a graduação e pela primeira oportunidade de me aventurar no mundo da pesquisa. Agradeço imensamente por todas as incríveis oportunidades, as quais foram fundamentais para o meu crescimento profissional. Obrigada por tudo!

Aos **amigos da especialização em prótese**, Thalisson, Marcelo, Jéssica e Larissa obrigada por toda a torcida e apoio. Adoro vocês!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	23
1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
2. PROPOSIÇÃO.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Delineamento experimental.....	35
3.2 Seleção e corte dos dentes.....	35
3.3 Permeabilidade dentinária.....	35
3.4 Análise da resistência de união.....	46
3.5 Análise dos dados.....	51
4. RESULTADOS.....	53
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	71
7. REFERÊNCIAS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μm - Unidade de comprimento (micrometro)
 μm^2 - Unidade de comprimento (micrometro quadrado)
 μl - Unidade de volume (microlitro)
 cm^2 - centímetro quadrado
 MPa - Unidade de tensão (MegaPascal)
 N - Unidade de força (Newton)
 Psi - Pound force per square inch (medida de pressão)
 cmH₂O - Medida de pressão (centímetro de água)
 min - minutos
 mm - milímetros
 pH - potencial hidrogênico
 LCNC - Lesão Cervical Não-Cariosa
 HD - Hipersensibilidade dentinária
 MMPs – Metaloproteinases
 MOD - Matriz orgânica desmineralizada
 EGCG - Epigallocatequina-3-galato
 NP - Dessensibilize Nano P
 SE - Solução experimental de quitosana
 Q - Taxa de filtração ($\mu\text{L}/\text{min}$)
 v_p - Volume padronizado (μL)
 D - Deslocamento da bolha no tubo capilar (mm)
 T - Tempo (min);
 L - Comprimento do capilar (mm)
 L_p - Condutância hidráulica expressa em $\mu\text{l}.\text{cm}^{-2}.\text{min}^{-1}.\text{cmH}_2\text{O}^{-1}$
 AS - Área de superfície dentinária exposta (cm^2)
 P_1 - Pressão hidrostática da solução dentro da câmara em (cmH₂O)
 P_2 - Pressão atmosférica em (cmH₂O)

CARVALHO, T. C. **Efeito de solução experimental de quitosana com extratos naturais nas propriedades físicas, morfológicas e adesivas da dentina radicular.** 2018. 83 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

RESUMO

O objetivo do estudo foi analisar as alterações provocadas na permeabilidade e morfologia da dentina radicular, quando tratada com uma solução experimental de quitosana contendo em sua composição os extratos naturais do chá verde (EGCG) e do fruto da planta gardênia (genipin), por meio da mensuração da condutância hidráulica da dentina e morfologia e avaliar seu efeito na resistência de união em restaurações de resina composta, por meio do ensaio de microtração. Os espécimes foram confeccionados a partir da dentina radicular de incisivos bovinos. Para o teste de permeabilidade dentinária e análise em microscopia confocal a laser, foram utilizados 45 discos de dentina, com 4mm de diâmetro e 1mm de espessura, divididos em 3 grupos (n=15): Controle, Dessensibilize Nano P (NP) e solução experimental de quitosana (SE). Foram realizadas 3 mensurações da permeabilidade dentinária: Permeabilidade mínima (presença da *smear layer* na face externa dos discos de dentina); permeabilidade máxima (remoção da *smear layer* com ácido cítrico 6%) e a permeabilidade pós-ciclagens/tratamentos (ciclagens erosivas com ácido cítrico 0,3% e tratamentos dessensibilizantes), com análise em microscopia confocal a laser após o desafio erosivo (permeabilidade máxima) e ao término das ciclagens/tratamentos. Posteriormente, foram confeccionados 30 espécimes de 6 x 6mm, divididos nos grupos (n=10) de acordo com o tratamento dessensibilizante (controle – sem tratamento; Dessensibilize Nano P; solução experimental de quitosana) para ensaio de microtração. Foram realizadas as aplicações dos agentes dessensibilizantes na superfície da dentina desmineralizada, após a exposição ao ácido clorídrico (pH 1,2), com posterior confecção de um platô de 4mm de resina composta. Os espécimes restaurados foram cortados em fragmentos de 1mm de largura por 1mm de espessura e levados a máquina de ensaios universais para o teste a uma velocidade de 0,5 mm/minuto, com célula de carga de 500 N. Os padrões de fratura foram analisados em microscópio confocal a laser. As permeabilidades máxima e mínima em relação a pós-ciclagem/tratamentos dentro de cada grupo e entre os grupos, foram analisados pelo teste de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). Para a microtração foi empregado ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=5\%$). Os dados foram analisados, quanto ao número, área e perímetro dos túbulos, pelo teste de Kruskal- Wallis ($\alpha=5\%$). Os grupos NP e SE apresentaram diminuição significativa da

permeabilidade dentinária para todas as análises, porém no grupo controle houve um aumento da condutância hidráulica. SE não influenciou na resistência de união em resinas compostas, contudo, NP a reduziu significativamente. O maior número de obliterações dos túbulos dentinários foi verificado para o grupo SE. Pode-se concluir que SE promoveu um efeito na diminuição da permeabilidade, obliterando os túbulos dentinários, sem afetar a resistência adesiva.

Palavras-chave: Hipersensibilidade dentinária; Erosão dentinária; Dessensibilizantes; Permeabilidade dentinária; Dentina radicular.

CARVALHO, Tatiana Carvalho. **Effect of chitosan experimental solution with natural extracts on physical, morphological and adhesive properties of root dentin**. 2018. 83 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the changes in root dentin permeability and morphology when treated with a chitosan experimental solution containing green tea (EGCG) and gardenia fruit (genipin) natural extracts, through the dentin hydraulic conductance measurement and morphology and to evaluate its effect on bond strength in composite resin restorations, through the microtensile test. Specimens were made from the root dentin of bovine incisors. For the dentin permeability test and laser confocal microscopy analysis, 45 dentin disks with 4mm diameter and 1mm thickness were used, divided into 3 groups (n = 15): control (C), Desensibilize Nano P (NP) and chitosan experimental solution (ES). Three measurements of dentin permeability were performed: Minimum permeability (smear layer presence on the dentin discs outer face); maximum permeability (removal of smear layer with 6% citric acid) and post-cycling permeability/treatments (citric acid 0.3% erosive cycling and desensitizing treatments), with laser confocal microscopy after the erosive challenge (maximum permeability) and at the end of the cycling/treatments. Thereafter, 30 specimens of 6 x 6mm were divided into groups (n = 10) according to the desensitizing treatment (control - without treatment; Desensibilize Nano P; chitosan experimental solution) for microtensile test. The desensitizing agents were applied to the surface of the demineralized dentin after exposure to hydrochloric acid (pH 1.2), thereafter a 4mm plateau of composite resin was made. The restored specimens were cut into 1x1 mm fragments and taken to the universal test machine for testing at a 0.5 mm / min speed with a 500 N load cell. The fracture patterns were analyzed in a confocal laser microscope. Mann-Whitney test ($\alpha = 5\%$) was used for comparisons of maximum and minimum permeability to post-cycling / treatments within each group and between groups. For microtraction, in means comparison between groups, ANOVA 1 criteria with Tukey test ($\alpha = 5\%$) was used. The data obtained from the difference between the final and the initial for dentin tubules number, area and perimeter were submitted to the Kruskal-Wallis test ($\alpha = 5\%$). The NP and ES groups showed a significant decrease in dentin permeability for all analyzes, but in the control group there was an increase in the hydraulic conductance. ES did not influence in dentin bond strength of composite resins, however, NP

reduced it significantly. The largest number of dentinal tubules obliterations was verified in ES group. It can be concluded that ES decrease dentin permeability, closed dentin tubules without negatively affected the adhesion.

Key words: Dentin hypersensitivity; Dentin erosion; Desensitizers; Dentin permeability; Root dentin.

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

A erosão dental é um processo químico crônico (SILVEIRA et al., 2014) e ocorre devido a perda de substâncias, principalmente minerais, devido à frequente exposição das superfícies dos dentes aos ácidos exógenos ou endógenos, sem o envolvimento bacteriano e com alterações histológicas no tecido duro dental (CHUAJEDONG, 2002; JAEGGI et al., 2006; LUSSI et al., 2006a; HUYSMANS et al., 2011; HANNAS et al., 2016). Os ácidos exógenos incluem os alimentos, as bebidas, os medicamentos e os produtos ácidos presentes no ambiente de trabalho ou atividades esportivas (LUSSI et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2009).

Os ácidos endógenos são oriundos do estômago de pacientes que apresentam patologias como o refluxo gastroesofágico e bulimia (GRIPPO et al., 2012). Por consequência do aumento da exposição aos ácidos pela população em geral, a erosão é considerada o fator mais comum de desgaste dentário (LUSSI et al., 2006b; KREULEN et al., 2010; NAHÁS PIRES CORRÊA et al., 2011).

Com a erosão do esmalte e em casos de recessões gengivais, a dentina pode ser exposta ao meio bucal, onde começa seu complexo processo de erosão. Quando os ácidos entram em contato com a dentina, os minerais da dentina peritubular/intertubular são removidos, assim a dentina peritubular é perdida mais rapidamente e os túbulos dentinários se alargam (MEURMAN et al., 1991; BUZALAF et al., 2012). Subsequentemente, uma camada superficial da matriz orgânica desmineralizada (MOD) é exposta e tem como componente principal as fibras colágenas, especialmente, o colágeno tipo I. Contudo, a MOD dificulta a difusão iônica para dentro e fora da área desmineralizada, favorecendo uma progressão mais lenta do processo erosivo (KLONT et al., 1991; KLETER et al., 1994; TERSARIOL et al., 2010).

No entanto, a MOD é degradada, pois a dissolução do mineral expõe a matriz orgânica à decomposição por bactérias, bem como pelas enzimas do próprio hospedeiro, as metaloproteinases (MMPs) (KLONT et al., 1991; KLETER et al., 1994; TERSARIOL et al., 2010), além de expor à forças mecânicas como a abrasão (GANSS et al., 2007, 2009). Em suma, a degradação da dentina ocorre devido à dissolução ou desnaturação das proteínas orgânicas e moléculas de proteoglicano, que ligam a rede de colágeno com os cristais de

hidroxiapatita na dentina (SAHEBI, MOAZAMI, ABBOTT, 2010; YASSEN et al., 2013).

As MMPs presentes na dentina e na saliva são responsáveis pela hidrólise dos componentes da matriz extracelular da porção orgânica, durante os processos de remodelação e degradação no meio bucal (INGMAN et al., 1996; MOSLEMI et al., 2008). São secretadas como precursores inativos, que precisam ser ativadas. A ativação ocorre com a exposição das fibrilas colágenas após a remoção da porção mineral do tecido por um processo de redução do pH (abaixo de 4,5), mas embora ativadas, as MMPs não podem degradar a matriz orgânica da dentina em um pH ácido, sendo necessário, portanto, sua neutralização para que ocorra a degradação. Esse mecanismo está presente nos processos de cárie e erosão (TJADERHANE, 1998; BUZALAF et al., 2012a; TJADERHANE et al., 2013).

Na dentina são identificadas as MMPs -2, -3, -8 e -9 (TJADERHANE, 1998; MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; SULKALA et al., 2007; SANTOS et al., 2009; MAZZONI et al., 2009, 2011; KATO et al., 2011). A literatura (MAGALHÃES et al., 2009; KATO et al., 2009, 2010) vem demonstrado que produtos inibidores das MMPs podem favorecer a prevenção do processo de desmineralização, principalmente ocasionado pela erosão.

Como forma de inibir o processo erosivo, nos últimos anos inibidores naturais de MMPs vem ganhando cada vez mais atenção. Rico em polifenóis, o chá verde (*Camellia sinensis*) tem sido relatado como um importante inibidor de MMPs, principalmente por meio do seu polifenol denominado epigallocatequina-3-galato (EGCG), que realiza ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com as collagenases. Foi relatado também sua propriedade antiinflamatória (CABRERA et al., 2006) e aumento da microdureza da dentina após o tratamento (MIRKARIMI e TOOMARIAN, 2012). Estudos identificaram que o EGCG possui atividade inibitória das MMPs -2, -9 (BAE et al., 2008), as quais participam da erosão da dentina (DEMEULE et al., 2000; MAGALHÃES et al., 2009; KATO et al., 2009).

A melhora das propriedades dos tecidos dentais pode ser um método alternativo para prevenir a erosão, como também, melhorar a resistência ao ácido e reduzir o efeito de desmineralização (WANG et al., 2018).

A quitosana é um polissacarídeo e biopolímero hidrofílico (2-amino-2-desoxi-p-glucopirranose) com grande número de grupos hidroxilo e amino livres, os quais podem possibilitar a formação de reticulações com outras moléculas reativas (WANG et al., 2003;

MADHAVAN et al., 2010). Os grupos reativos livres podem interagir e formar ligações químicas com o colágeno (WANG et al, 2003; MADHAVAN et al., 2010). Sua incorporação e reticulação ao colágeno dentinário exibe um aumento das propriedades mecânicas da matriz orgânica, bem como uma maior resistência à degradação pela collagenase bacteriana (SHRESTHA et al., 2011; FAWZY et al., 2013; KISHEN et al., 2016).

A obtenção da quitosana se dá através da desacetilação da quitina, pode ser preparada na forma de hidrogéis e tem sido utilizada em outros estudos da Área de Odontologia Restauradora/FORP-USP, em razão de ser uma macromolécula não tóxica, biocompatível, que pode ser utilizada para a veiculação de medicamentos e com comprovadas propriedades antiinflamatórias, considerada, portanto, como sendo um biomaterial (RAAFAT et al., 2009; SHRESTHA et al., 2014; KISHEN et al., 2016). Além disso, as nanopartículas da quitosana apresentam excelentes propriedades anti-biofilme e também inibem a adesão bacteriana à dentina (KISHEN et al., 2008). Em estudo recente (SANCHES et al., 2016), observou-se que a solução experimental com quitosana diminuiu o número de túbulos expostos, podendo então favorecer a redução da permeabilidade da dentina.

Além da quitosana, o genipin também foi relatado como um excelente agente natural formador de ligação-cruzada para proteínas, colágeno (HIRAISHI et al., 2013; NAGAOKA et al., 2014) e em outros estudos foi utilizado reticulando a quitosana (MUZZARELLI, 2015; VARONI et al., 2017). Genipin é um extrato natural de baixa toxicidade encontrado no fruto da planta *gardenia* (*Gardenia jasminoides*), é um agente eficaz no processo de ligação cruzada química de proteínas naturais, como a quitosana, contribuindo então para sua melhor estabilidade (SUNG et al, 2003), além de reagir com grupos amina dentro e entre as moléculas de colágeno para formar reticulações intra e intermoleculares, fazendo com que a progressão do processo erosivo se dê de maneira mais lenta (MI et al., 2003; BEDRAN-RUSSO et al., 2007; WALTER et al., 2008; MUZZARELLI, 2009).

Qualquer tentativa de tratamento que estabilize a ultraestrutura do colágeno dentinário e neutralize o efeito das collagenases, poderá melhorar significativamente a integridade dos dentes (KISHEN, 2015). Assim, a reticulação vem sendo muito utilizada para a melhora da estabilidade mecânica e biológica da dentina, frente a processos de degradação/erosão (BEDRAN-RUSSO et al, 2007; SHRESTHA, 2011; FAWZY et al., 2012).

Com o envolvimento da dentina em estágios mais avançados da erosão (FARAONI et al., 2018), a exposição dos túbulos dentinários pode ocasionar o desenvolvimento da

hipersensibilidade dentinária (SU et al., 2003; MANTZOURANI e SHARMA, 2013; BEKES e HIRSCH, 2013; WEST et al., 2013; WANG et al., 2018). A hipersensibilidade dentinária (HD) é um problema clínico global de saúde bucal da população adulta. É definida como uma "dor decorrente da dentina exposta, em resposta a estímulos térmicos, táteis, osmóticos ou químicos, que não pode ser atribuída a qualquer outro tipo de defeito dental ou patologia" (HOLLAND et al., 1997; ADDY, 1990; WEST, 2006; MARKOWITZ e PASHLEY, 2008) e está em conformidade com todos os critérios para ser classificada como uma síndrome dolorosa (CURRO, 1990). É clinicamente descrita como uma dor curta, aguda e que se dissipa rapidamente, pode ser localizada ou generalizada (ORCHARDSON e GILLAM, 2006) e pode afetar as atividades do dia a dia dos pacientes. (LUSSI e HELLWIG, 2013). Consideráveis esforços em pesquisas vêm sendo realizados para compreensão dos processos que conduzem à HD e no desenvolvimento de tratamentos eficazes para aliviar seus sintomas e preveni-la (MANTZOURANI e SHARMA, 2013).

O mecanismo ainda é incerto e a hipótese mais aceita é baseada na teoria hidrodinâmica (BRÄNNSTRÖM e ÅSTRÖM, 1964; SAURO et al., 2010; ZHONG et al., 2015; ESTEVES et al., 2016 CANALI et al., 2017), que afirma que a hiperestesia resulta da movimentação dos fluidos dentro dos túbulos dentinários, causada por mudanças na temperatura ou alterações físicas ou osmóticas. Os mecanorreceptores na interface polpa-dentina estimulam a condução de nervos mielinizados para produzir dor em resposta aos estímulos. A dor é o resultado dos fluxos interno e externo do fluido tubular dentinário (BRÄNNSTRÖM, 1963).

O desconforto causado pela HD é uma das queixas dentárias mais comuns. Estudos epidemiológicos demonstraram que a prevalência de hipersensibilidade dentinária varia de 2% a 98%, dependendo da população estudada e o tipo de estudo (FLYNN et al., 1985; MURRAY e ROBERTS, 1994; CHABANSKI et al., 1996; LIU et al., 1998; CANALI et al., 2017).

Em pesquisa realizada com cirurgiões-dentistas, verificou-se que 78,7% responderam que vem ocorrendo um aumento da prevalência da HD e concordaram que é um desafio para a saúde bucal a longo prazo e que afeta a qualidade de vida dos seus pacientes (88%) (STRASSLER et al. 2008). O pico de incidência ocorre entre a terceira e quarta décadas de vida (QUE et al., 2010), raramente é detectada entre os grupos mais jovens e menos frequentemente nos indivíduos mais idosos (TAGAMI et al., 1992). Em geral parece haver

uma maior prevalência em mulheres do que em homens (ORCHARDSON e COLLINS, 1987; FISCHER et al., 1992), ocorre principalmente nas superfícies cervicais vestibulares, sendo os dentes mais afetados os caninos e primeiros pré-molares (KAWASAKI et al., 2001; MANTZOURANI e SHARMA, 2013).

A pré-disposição ao desenvolvimento da HD é a exposição da dentina (ADDY, 2002), sendo que a prevalência vem sendo favorecida pelas recentes mudanças no estilo de vida da população, onde ocorreram alterações na dieta e nos hábitos alimentares (WEST, 2013; SOARES, et al., 2015). Além disso, as lesões cervicais não cariosas (LCNC), patologia com forte relação com a HD (OH, 2017), vêm aumentando a sua incidência devido à maior permanência dos dentes em função e é ocasionada pela interação dos fatores, fricção (desgaste causado pela abrasão), estresse (abfração) e biocorrosão (degradação química, bioquímica e eletroquímica – envolve os ácidos endógenos, exógenos, proteólises e o efeito piezoelétrico na dentina) (GRIPPO et al., 2012). As LCNC são definidas como a perda de estrutura dentária na região cervical do dente, onde as forças de tensão estão mais localizadas e frequentemente resultam em problemas estéticos, hipersensibilidade, incomodo para o paciente e em casos mais extremos podem causar a fratura do dente (GRIPPO et al., 2013).

No tratamento, a aplicação tópica de dessensibilizantes pode ser realizada anteriormente ao procedimento restaurador (ARISU et al., 2011), no entanto o efeito desses agentes na resistência de união ainda é controverso (CORTIANO et al., 2016). Alguns estudos relatam que a resistência de união à dentina, em restaurações de resina composta, é reduzida após o tratamento com os agentes dessensibilizantes como resultado da pouca infiltração dos sistemas adesivos, causada pela precipitação de partículas na superfície da dentina (AKCA et al., 2007; VACHIRAMON et al., 2008; DE ANDRADE et al., 2010; ARISU et al., 2011). Por outro lado, outros estudos (TAY et al., 2003; BASEGGIO et al., 2009; SHAFIEI et al., 2010; DEMORAES PORTO et al., 2012), demonstraram não haver redução da resistência de união e, além disso, indicaram que o potencial oclusivo poderia facilitar a formação de uma camada híbrida mais estável e homogênea, o que poderia dificultar a degradação hidrolítica da interface adesiva.

Estudos verificaram que produtos contendo nano-hidroxiapatita (nano-HA) apresentam efeitos remineralizantes mais elevados quando comparados com os fluoretados (TSCHOPPE et al., 2011) e foram eficazes na redução da HD, devido a maior facilidade de penetração das nano partículas nos túbulos dentinários, promovendo assim, melhor selamento

(WANG et al., 2016). A nano-HA é considerada um dos materiais mais biocompatíveis e bioativos e é amplamente utilizada na odontologia por apresentar nanopartículas com morfologia e estrutura semelhantes à apatita dental (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

Os tratamentos da HD são classificados por seu mecanismo de ação em dessensibilização neural, quando impedem a transmissão de impulsos nervosos, ou obliteradora, quando ocluem os túbulos dentinários (DAVARI et al., 2013). O tratamento obliterador é baseado em ocluir os túbulos dentinários para bloquear o mecanismo de estimulação hidrodinâmico e consequentemente a dor. A deposição de uma camada de componentes sobre a dentina exposta pode provocar essa oclusão. Além disso, a remineralização da superfície da dentina exposta com a deposição ou a precipitação de partículas finas, também auxiliam na oclusão dos túbulos dentinários (CUMMINS et al., 2010).

No entanto, é importante considerar que, se a oclusão dos túbulos é apenas superficial, a saliva ou o contato com os ácidos pode facilmente expor os túbulos dentinários novamente, levando a efeitos dessensibilizadores de curto prazo (SAURO et al., 2010). Portanto, independentemente do método de tratamento escolhido, o maior desafio é alcançar a eficácia a longo prazo. Sendo assim, é importante avaliar o comportamento dos agentes dessensibilizantes quando expostos às condições variáveis, bem como variações do pH em processos erosivos (CANALI et al., 2017).

Dessa forma, estudos para determinar a eficácia de agentes dessensibilizantes com componentes que melhorem as propriedades do tecido dentinário frente a processos erosivos, seriam de grande valia para o controle duradouro da hipersensibilidade dentinária.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi analisar as alterações na permeabilidade e morfologia da dentina radicular, quando tratada com uma solução experimental a base de quitosana contendo extratos do chá verde (EGCG) e da gardênia (Genipin), por meio da mensuração da condutância hidráulica da dentina e morfologia do substrato e avaliar seu efeito na resistência de união à dentina de restaurações de resina composta, por meio do ensaio de microtração.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

O fator de estudo foi o tratamento da superfície dentinária em 3 níveis: controle (sem tratamento), solução experimental de quitosana e Desensibilize Nano P (FGM). As análises quantitativas foram por condutância hidráulica expressa em $\mu\text{l.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}.\text{cmH}_2\text{O}^{-1}$, contagem, perímetro e área dos túbulos dentinários e ensaio de microtração. As análises qualitativas foram realizadas através da morfologia do substrato após a aplicação dos agentes dessensibilizantes e análise da fratura após o ensaio de microtração.

3.2 Seleção e corte dos dentes

Incisivos bovinos íntegros, visivelmente sem manchas, foram previamente selecionados para a obtenção dos espécimes. Após limpeza com taça de borracha, pedra pomes e água, foram armazenados em solução de timol 0,1% para desinfecção com posterior lavagem em água corrente por 24 horas. Os dentes foram seccionados no sentido transversal com disco de corte diamantado (#7015, KG Sorensen, Barueri) sob refrigeração e auxílio da máquina de corte de precisão (Miniton, Struers A/S, DK-2610, Copenhagen, Dinamarca) na junção cemento-esmalte separando a coroa da raiz. Posteriormente foi realizado um corte longitudinal na raiz separando-a em duas partes (Figura 1).

Figura 1. Confecção dos espécimes. A. Incisivo bovino íntegro. B. Corte transversal na junção cemento-esmalte. C. Corte longitudinal da raiz.

3.3 Permeabilidade dentinária

Confecção das amostras para o teste de permeabilidade dentinária

Para a confecção das amostras do teste de permeabilidade, foram realizados cortes na dentina radicular mais próxima a junção cimento-esmalte, utilizando uma broca trefina longa (Wf Cirúrgicos, Maringá, Paraná) com diâmetro interno de 4mm, obtendo assim, 45 fragmentos de dentina radicular circulares.

Para a padronização da espessura dos fragmentos e formação da *smear layer*, as superfícies foram polidas em politriz (Arotec APL-4, Arotec Indústria e Comércio, São Paulo-SP, Brasil), sob refrigeração com lixa de granulação #1200 e #2000 (Norton Abrasivos Ltda, São Paulo-SP, Brasil), com a finalidade de remoção do cimento e planificação das superfícies. Para auxiliar no polimento foi utilizado um dispositivo metálico com orifício para adaptação do espécime e um parafuso que permite a determinação da profundidade. O fragmento foi posicionado nesse orifício e alinhado com a superfície do dispositivo, girando-se o parafuso na porção inferior (Figura 2).

Primeiramente a face pulpar dos espécimes foi planificada com lixa de granulação #1200. Posteriormente o espécime foi virado no dispositivo e a face externa da dentina foi desgastada até atingir a espessura de 1,30 mm, feito isso, agora utilizando a lixa de granulação #2000, o desgaste foi realizado até 1,10 mm e o polimento foi feito com disco de feltro e suspensão de alumina 0,3 e 0,5 μ m (Arotec Sj685/A Ind, e Comércio, São Paulo/SP, Brasil). Ao final desse processo foram obtidos espécimes com 1mm de espessura e 4 mm de diâmetro (Figura 3). As amostras foram armazenadas em água destilada até o momento dos experimentos.

Figura 2. Confecção das amostras para o teste de permeabilidade dentinária. A. Broca trefina longa utilizada para os cortes nas raízes. B. Fragmento de dentina radicular obtido após o corte com broca. C. Desgaste e polimento das amostras em politriz com auxílio do dispositivo metálico.

Figura 3. Aspecto final das amostras para o teste de permeabilidade dentinária com 4mm de diâmetro e 1 mm de espessura.

Teste de permeabilidade dentinária

A mensuração da permeabilidade foi realizada através do aparelho THD03 (Odeme Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda, Joaçaba, SC, Brasil). O aparelho é composto por uma câmara de pressão e outra de filtração, que são interligadas por um tubo capilar de vidro, além de um sistema para a injeção da bolha de ar e um paquímetro digital. A câmara de filtração permite a colocação de um disco de dentina, entre dois anéis de borracha do tipo O'ring, os quais proporcionam uma adequada vedação e uma área padronizada de 0,05817 cm², exposta a pressão de 6,5 psi. O lado pulpar do disco de dentina é colocado em contato com um fluido sob pressão e o lado oclusal, em contato com o ambiente em pressão atmosférica (GREENHILL, PASHLEY, 1981; SANTIAGO et al., 2006; CARVALHO et al., 2012; THANATVARAKORN et al., 2013). A água destilada sai do reservatório e passa através do tubo capilar, seguindo até a câmara de filtração. Após o preenchimento de todo o sistema com a água, uma pequena bolha de ar é inserida através do sistema de injeção, penetrando no interior do tubo capilar (Figura 4).

Figura 4. Componentes do aparelho de permeabilidade dentinária. A. Aparelho para mensuração da permeabilidade dentinária. B. Tubo capilar que interliga o reservatório com a câmara de filtração e paquímetro para mensuração do deslocamento da bolha. C. Posicionamento do disco de dentina entre os o-rings na câmara de filtração. D. Câmara de filtração fechada com o disco de dentina em posição.

A taxa de movimento do fluido através do disco de dentina foi medida seguindo-se o deslocamento linear da bolha de ar dentro do tubo capilar, através do qual passa a solução, utilizando um paquímetro digital com resolução de 0,01 mm (KOLKER et al., 2002; SANTIAGO et al., 2006).

Com o valor obtido, que corresponde ao deslocamento da bolha no tubo capilar, foi possível obter o índice de filtração utilizando a seguinte fórmula:

$$Q = \frac{v_p \cdot D}{L \cdot T}$$

Sendo :

Q = Taxa de filtração ($\mu\text{L}/\text{min}$);

v_p = Volume padronizado (μL);

D = Deslocamento da bolha no tubo capilar (mm);

T = Tempo (min)

L = Comprimento do capilar (mm)

A permeabilidade dentinária é expressa em valores de condutância hidráulica (L_p) (REEDER et al., 1978; SANTIAGO et al., 2006), onde:

$$L_p = Q/AS(P_1 - P_2)$$

L_p = condutância hidráulica expressa em $\mu\text{L} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1}$;

Q = Taxa de filtração ($\mu\text{L} \cdot \text{min}$);

AS = Área de superfície dentinária exposta (cm^2);

P_1 = Pressão hidrostática da solução dentro da câmara em (cmH_2O);

P_2 = pressão atmosférica em (cmH_2O).

Condições experimentais

A permeabilidade dentinária foi mensurada em três momentos, na seguinte ordem experimental:

1. Pré-desafio erosivo, na presença de *smear layer* (permeabilidade mínima);
2. Pós-desafio erosivo (permeabilidade máxima);
3. Após a ciclagem erosiva e tratamentos;

Durante todo o experimento, os espécimes foram mantidos em saliva artificial e armazenados em estufa a 37°C .

Figura 5. Etapas experimentais do teste de permeabilidade dentinária.

Mensuração da permeabilidade pré-desafio erosivo (Permeabilidade mínima)

A presença de *smear layer* é considerada uma condição efetiva para obstruir os túbulos dentinários e reduzir o fluxo de líquidos, obtendo-se assim, valores mínimos de permeabilidade dentinária. É uma forma de comparação com dentes não sensíveis e é tida como uma condição de obstrução tubular que deve ser reproduzida pelos agentes dessensibilizantes.

Para tanto, os espécimes foram isolados com silicone de adição (Variotime – Heraeus Kulzer), para que o ataque ácido com ácido fosfórico 37% fosse realizado apenas na face

pulpar dos discos de dentina, a fim de se retirar a *smear layer* formada durante os processos de planificação e polimento, mantendo-a somente na face oclusal (Figura 6). O ataque ácido foi realizado por 15 segundos, com posterior lavagem com água destilada pelo mesmo tempo e secagem com papel absorvente. Feito isso, as amostras foram levadas ao aparelho de permeabilidade dentinária para mensuração.

Figura 6. Isolamento da face pulpar do disco de dentina para remoção da *smear layer* com ácido fosfórico 37%. A. Silicone de adição utilizado para isolamento da face pulpar do disco de dentina. B. Disco de dentina com a face pulpar isolada. C. Ataque ácido com ácido fosfórico 37%.

Mensuração da permeabilidade pós-desafio erosivo (Permeabilidade máxima)

Foi realizado desafio erosivo na face externa do disco de dentina (Figura 7) utilizando ácido cítrico a 6% (pH 1,70) por 3 minutos (SHARMA et al., 2013) sob agitação, a fim de simular os processos erosivos que ocorrem na cavidade bucal, com consequente abertura dos túbulos dentinários, conferindo a dentina, valores máximos de permeabilidade dentinária, isto é, o mais rápido deslocamento de fluido através desse substrato, simulando em laboratório uma condição clínica de hipersensibilidade dentinária. Ao final dos 3 minutos, as amostras foram colocadas em água destilada e em cuba ultrassônica durante 1 minuto e 30 segundos. Após o desafio a permeabilidade foi novamente mensurada e foi realizada a 1ª análise em microscopia confocal.

Figura 7. Disco de dentina com a face externa isolada para desafio erosivo com ácido cítrico 6%.

Mensuração da permeabilidade após a ciclagem erosiva e tratamentos

Posteriormente ao desafio erosivo, as amostras foram divididas aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=15) (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos experimentais

Material	Composição	Aplicação
Solução experimental de quitosana <i>Grupo SE</i>	Quitosana; EGCG; Genipin.	Com um pincel do tipo microbrush, aplicar na dentina e friccionar por 1 minuto. Manter a solução em posição por mais 1 minuto. Após, remover com jatos de água destilada.
Desensibilize Nano P (FGM) <i>Grupo NP</i>	Fosfato de Cálcio nanométrico (na forma de hidroxiapatita); Fluoreto de Sódio; Nitrato de Potássio; Água destilada; Espessante; Tensoativo; Umectante; Aroma; Adoçante; Conservante.	Aplicar com o auxílio de um microbrush, friccionar o produto na dentina por 10 segundos e deixar em contato por 5 minutos. Remover o excesso com bolinha de algodão umedecida.
Controle (Saliva artificial)	Carboximetilcelulose (CMC); Cloreto de potássio (KCL); Cloreto de magnésio hexaidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$); Cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$); Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4); Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4).	-----

A aplicação dos tratamentos foi realizada no início do dia (Figura 8). Após o procedimento os espécimes foram imersos em saliva por 30 minutos e em seguida, foram submetidos à ciclagem erosiva do dia. Ao todo foram 3 aplicações com intervalo de 72 horas entre elas.

Figura 8. Aplicação dos tratamentos dessensibilizantes. A. Aplicação do Nano P. B. Aplicação da solução experimental de quitosana.

Os espécimes do grupo controle não foram submetidos a nenhum tratamento, mas foram submetidos a todas as condições experimentais, sendo somente armazenados em saliva artificial com o objetivo de análise da real eficácia da substância obliterante.

Ciclagem erosiva e tratamentos

Levando em consideração que após o tratamento da hipersensibilidade dentinária os pacientes em sua maioria continuam sob ação de ácidos extrínsecos, a superfície de dentina externa foi submetida a desafios com ácido cítrico a 0,3% (pH 2,45), por 5 minutos, sob agitação (Mesa agitadora CT155, Cientec Piracicaba – SP, Brasil) e a temperatura ambiente, com o objetivo de se reproduzir essa situação clínica e verificar a permanência e a ação da substância obliterante no substrato dentinário (Figura 9).

Figura 9. Desafio erosivo. A. Amostra imersa em ácido cítrico 0,3%. B. Mesa agitadora (CT155, Cientec Piracicaba – SP, Brasil).

Posteriormente ao desafio, as amostras foram armazenadas em saliva artificial e levadas a estufa por 2 horas. Esse ciclo foi repetido três vezes ao dia e ao final de toda a ciclagem erosiva e dos tratamentos, foi realizada a 2ª análise em microscopia confocal (Figura 10).

Os tratamentos e a ciclagem erosiva foram realizados da seguinte maneira:

Figura 10. Sequência das aplicações dos tratamentos, ciclos erosivos e análises em Microscopia Confocal a Laser. A ciclagem erosiva corresponde a 3 desafios erosivos, com 2 horas de intervalo entre eles.

A permeabilidade dentinária foi novamente mensurada ao final do processo.

Análise em microscopia confocal

A análise da imagem em microscopia foi realizada com o intuito de correlacionar os dados da permeabilidade dentinária e sua aparência microscópica e avaliar as alterações morfológicas provocadas no substrato dentinário, pelos tratamentos dessensibilizantes. Os espécimes foram levados para análise em microscópio confocal (LEXT 4000, Olympus, Japão) (Figura 11) em dois momentos, logo após o desafio erosivo (permeabilidade máxima) e ao término da ciclagem erosiva e tratamentos. Para isso, as duas imagens com 2131x de aumento (objetiva de 100x) foram obtidas da mesma região em cada espécime.

Figura 11. A. Microscópio confocal a laser. B. Espécime posicionado para a avaliação da superfície dentinária externa.

Por meio do software OLS 4000 foi localizado e avaliado o aumento/diminuição do número, da área (μm^2) e do perímetro (μm) dos túbulos dentinários antes e após as ciclagens erosivas/tratamentos (quantitativamente) (Figura 12).

Figura 12. Interface do Software Olympus LEXT OLS4000: detecção, contagem e dimensão dos túbulos dentinários expostos.

3.4 Análise da resistência de união

Confecção dos fragmentos

As metades das raízes dos incisivos bovinos cortadas longitudinalmente foram cortadas de maneira transversal na região mais próxima à união cimento-esmalte (Figura 13) e posteriormente tiveram suas superfícies externas desgastadas em politriz (Arotec APL-4, Arotec Indústria e Comércio, São Paulo-SP, Brasil), sob refrigeração com lixa de granulação #600 (Norton Abrasivos Ltda, São Paulo-SP, Brasil), para a remoção do cimento e planificação da superfície, obtendo uma área de 6 x 6mm. Os espécimes foram divididos nos grupos (n=10) de acordo com o tratamento dessensibilizante (controle – sem tratamento; Dessensibilize Nano P; solução experimental de quitosana).

Figura 13. Cortes transversais da raiz. A. Vista por cima; B. Vista frontal.

Desafio erosivo

Com exceção da superfície de dentina externa planificada, todas as outras foram impermeabilizadas com cera rosa 7 (Lysanda Produtos Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil), para que então o processo erosivo fosse realizado (Figura 14).

Figura 14. Amostra impermeabilizada com cera rosa 7.

Inicialmente os espécimes foram armazenados individualmente em 5 ml de saliva artificial (AMAECHI et al., 1999) por 2 horas a 37°C e em seguida foram submersos individualmente em 5ml de ácido clorídrico (HCl) líquido (pH 1,2, / 0,1 Molar) pelo tempo de 20 segundos, sob agitação. Foram realizadas 3 exposições ao ácido clorídrico e entre cada exposição os espécimes foram armazenados em saliva artificial (AMAECHI *et al.*, 1999) a 37°C pelo período de 12 horas. A quantidade de saliva artificial utilizada foi de 5 ml por espécime (Figura 15).

Após esse período foram realizados os tratamentos na superfície de dentina dos espécimes dos grupos NP e SE e então as amostras foram armazenadas em estufa por 24 horas. O modo de aplicação do Nano P e da solução experimental de quitosana foi realizado da mesma maneira já descrita para o teste de permeabilidade dentinária.

Figura 15. Processo erosivo

Passadas 24 horas foram realizadas as restaurações nos espécimes. Foi utilizado o sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray Corp., Tokyo, Japan), com aplicação do primer por 20 segundos e leve jato de ar, seguido da aplicação do adesivo, leve jato de ar e fotopolimerização por 10 segundos. A resina composta utilizada nas restaurações foi a Filtek Z 250 XT (3M ESPE, Seefeld, Germany) (Figura 16), onde foi confeccionado um platô de resina com 4,0 mm de altura, com a inserção em 4 incrementos de 1,0 mm cada e fotopolimerização por 20 segundos, após cada inserção, no modo contínuo.

Figura 16. Materiais utilizados nas restaurações dos espécimes. A. Adesivo Clearfil SE Bond. B. Resina Filtek Z 250 XT.

Os espécimes restaurados foram levados à estufa a 37°C por 24 h. Em seguida os foram fixados em uma base de acrílico (lâmina de plexiglas) com auxílio de cera para escultura (Kota Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e com disco de corte diamantado (#7015, KG Sorensen, Barueri), foram realizadas secções para obtenção de palitos (fragmentos), de aproximadamente 1x1mm de espessura. A espessura foi controlada com o auxílio de um paquímetro universal eletrônico com precisão de 0,01 mm (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil), sendo descartados aqueles com área $<0,8$ e $>1,2$ mm² e anotado para posterior determinação dos valores de resistência adesiva.

Figura 17. Esquema da metodologia de avaliação da resistência de união

Ensaio de microtração

Para o ensaio de microtração os fragmentos foram fixados pelas suas extremidades em placas, por meio de um adesivo instantâneo a base de cianoacrilato (Superbonder: Gel-Henkel

Loctite Adesivos LTDA, São Paulo, SP, Brasil), associado ao monômero da resina acrílica para aceleração da secagem, de modo a permanecerem posicionados paralelamente ao longo eixo da força de microtração. Posteriormente, foram levados à máquina de ensaios universal (Modelo MEM 2000, EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil) (Figura 18).

Figura 18. Ensaio de microtração. A. Fragmento fixado na placa. B. Dispositivo com a placa em posição.

O teste foi realizado a uma velocidade de 0,5 mm/minuto, utilizando uma célula de carga de 500 N. No momento da fratura o movimento foi imediatamente cessado e os valores finais de resistência à tração foram calculados pelo computador em Mpa (Figura 19), dividindo os valores de carga de ruptura, em Newton (N), pelas secções transversais das amostras, em mm^2 . A análise dos padrões de fratura foi realizada em todos os fragmentos utilizados neste ensaio, a partir de imagens 3D, vistas pelo microscópio confocal a laser (LEXT 4000, Olympus, Japão) com aumento de até 107 vezes e classificadas em: adesiva (rompimento na interface dentina/adesivo), coesiva em dentina (rompimento da estrutura dentinária), coesiva em resina (rompimento da resina composta) e mista (presença de fratura em dentina e resina composta em uma mesma amostra).

Figura 19. Ensaio de microtração. Momento da fratura do fragmento.

3.5 Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada utilizando o software SigmaStat (Systat Software, Inc).

Para a análise dos resultados de permeabilidade dentinária, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foram realizadas as comparações entre os valores de condutância hidráulica da permeabilidade pós-ciclagem/tratamentos, em relação aos valores da permeabilidade mínima e da permeabilidade máxima dentro de cada grupo. Foi feita também a diferença entre os grupos para as permeabilidades máxima e mínima em relação a pós-ciclagem/tratamentos.

Para a análise dos dados da resistência de união foi utilizado o teste ANOVA 1 critério com teste de Tukey, para a comparação das médias entre os grupos. Os dados obtidos da diferença entre o final e inicial para o número, área e perímetro dos túbulos, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis.

Todos os testes empregados admitiram nível de significância estatística de $\alpha=5\%$.

4. RESULTADOS

Permeabilidade dentinária

Os dados da permeabilidade pós-ciclagem/tratamentos em relação às permeabilidades máxima e mínima para todos os grupos, são exibidos nas figuras 20 e 21, respectivamente.

Figura 20 . Permeabilidades máxima e pós-ciclagem/tratamentos, mediana e quartis. As letras indicam comparação entre as permeabilidades, para cada grupo. Mesma letra indica similaridade estatística.

Na análise dos dados pode-se observar que os dois grupos de tratamento, NP e SE, apresentaram uma redução significativa da permeabilidade dentinária após a ciclagem e tratamentos ($p < 0,05$), como ilustrado na figura 20, em relação aos valores da permeabilidade máxima, esta que foi realizada logo após desafio erosivo com ácido cítrico 6%, causando então um tecido dentinário mais permeável.

Para o grupo controle, houve um aumento significativo dos valores de permeabilidade dentinária ($p < 0,05$), visto que não houve tratamento para esse grupo.

Figura 21. Permeabilidades mínima e pós-ciclagem/tratamentos, mediana e quartis. As letras indicam comparação entre as permeabilidades, para cada grupo. Mesma letra indica similaridade estatística.

A figura 21 ilustra os valores da permeabilidade pós-ciclagem/tratamentos em relação à permeabilidade mínima, realizada após o polimento das amostras, com a presença de *smear layer*. O grupo controle não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), enquanto os grupos NP e SE apresentaram uma diminuição significativa dos valores ($p < 0,05$), demonstrando a efetividade dos tratamentos.

Na diferença entre os grupos para as permeabilidades máxima e mínima em relação a pós-ciclagem/tratamentos (Tabela 2), houve um incremento significativo nos valores da condutância hidráulica para o grupo controle ($p < 0,005$) e uma diminuição significativa nos

valores para os grupos NP e SE ($p < 0,05$), na permeabilidade máxima, sendo que, os mesmos foram semelhantes entre si ($p > 0,05$).

Não foram encontradas diferenças significativas para as comparações entre os grupos em relação à permeabilidade mínima ($p > 0,05$).

Tabela 2. Medianas e quartis das permeabilidades mínima e máxima.

Grupos	Condutância hidráulica ($\mu\text{L.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}.\text{cmH}_2\text{O}^{-1}$)					
	Mínima			Máxima		
		25%	75%		25%	75%
Controle	0,0032 A	-0,0053	0,0265	0,0082 A	-0,0005	0,0318
Nano P	-0,0029 A	-0,0042	-0,0008	-0,0024 B	-0,0031	-0,0008
Solução	-0,0015 A	-0,0033	0,0006	-0,0031 B	-0,0035	-0,0024

*Valores negativos indicam a diminuição da permeabilidade dentinária. Letras maiúsculas indicam comparação na vertical. Mesma letra indica similaridade estatística.

Ensaio de microtração

A análise dos dados demonstrou que o tratamento com a solução experimental não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle, sendo assim, não influenciou na resistência de união em restaurações de resina composta ($p > 0,05$). Entretanto, o mesmo não aconteceu para o grupo NP, que apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da resistência de união em relação ao grupo controle.

As médias e os respectivos desvios-padrão estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Médias e desvio padrão dos grupos experimentais para a resistência de união (Mpa).

Grupo experimental	Médias $\pm$ DP
Controle	37,8 $\pm$ 9,88 A
Nano P	20,2 $\pm$ 8,59 B
Solução	29,1 $\pm$ 6,03 AB

*Mesma letra indica similaridade estatística

As distribuições percentuais dos tipos de fratura são exibidas na figura 22.

Figura 22. Porcentagem dos tipos de fraturas para os grupos experimentais.

Na análise do padrão de fratura o grupo controle, que não foi submetido a qualquer tratamento, apresentou as fraturas predominantes do tipo adesiva (94%), com um pequeno percentual de fratura coesiva em dentina (6%).

O mesmo aconteceu para o grupo Nano P, em que houve uma predominância de fraturas na interface adesiva (89%), com algumas fraturas coesivas em dentina (7%) e um pequeno percentual de fratura coesiva em resina (4%).

Por outro lado, para o grupo tratado com a solução experimental houve uma grande porcentagem de fraturas coesivas em dentina (43%), mas com as fraturas adesivas ainda em maior número (53%) e em pouca porcentagem a coesiva em resina (3%).

Análise confocal

Os resultados obtidos das análises de número, área e perímetro dos túbulos dentinários em microscopia confocal são descritos na tabela 4:

Tabela 4. Mediana e quartis da contagem, área (μm^2) e perímetro (μm) dos túbulos dentinários.

Grupos experimentais	Túbulos Dentinários			Área			Perímetro		
		25%	75%		25%	75%		25%	75%
Controle	6,00 A	-12,25	33,75	-3,50 A	-4,44	-1,67	-4,98 A	-6,08	-3,47
Nano P	-75,00 B	-105,50	-50,75	-8,80 B	-11,28	-5,01	-12,08 A	-14,09	-6,46
Solução	-222,00 C	-241,50	-196,5	-4,37 AB	-7,93	-3,26	-5,22 A	-16,78	-1,10

* Valores negativos indicam a diminuição do número, área e perímetro dos túbulos dentinários. Letras maiúsculas indicam comparação na vertical (coluna). Mesma letra indicada similaridade estatística.

Na análise de contagem do número de túbulos observou-se diferenças significativas entre as mensurações inicial e final para todos os grupos experimentais ($p < 0.001$). NP apresentou resultados positivos para a oclusão dos túbulos, mas obteve menor valor em comparação com SE ($p < 0,05$), que atingiu o maior número de obliteração dos túbulos dentinários, mesmo após a ciclagem simulando um processo erosivo, demonstrando ser uma obliteração mais estável.

A análise do grupo controle após a ciclagem constata um aumento significativo no número de túbulos dentinários ($p < 0,05$), confirmando os resultados encontrados para a permeabilidade da dentina.

Na avaliação da área nota-se que há diferenças apenas para o grupo NP, que quando comparado ao controle, causou uma redução significativa ($p < 0,05$), não havendo alterações para o grupo SE ($p > 0,05$).

Não foram encontradas diferenças para análise de perímetro dos túbulos em nenhum dos grupos ($p > 0,05$).

Análise Qualitativa – Microscopia Confocal

As alterações promovidas pela ciclagem e tratamentos no substrato dentinário estão exibidas nas Figuras 23 a 25.

Por consequência da ciclagem erosiva sem a associação com nenhum tratamento, pôde-se observar que no grupo controle houve perda de estrutura, fazendo com que os túbulos dentinários já expostos, aumentassem de tamanho, causando também a exposição de novos túbulos que antes estavam obliterados (Figura 23).

Nas imagens do grupo NP é possível notar que alguns túbulos dentinários foram obliterados, reduzindo em parte o número e a embocadura dos mesmos (Figura 24). Em contrapartida, para o grupo em que houve a aplicação da solução experimental, observa-se uma deposição de partículas no interior dos túbulos dentinários, causando a obliteração em sua totalidade. Nota-se também, a alteração do substrato, principalmente na dentina inter e peritubular (Figura 25).

Figura 23. Imagens representativas das alterações no substrato dentinário para o grupo controle. A. Dentina na fase inicial; B. Dentina no estágio final. Setas amarelas: Os túbulos dentinários ficaram mais amplos após as ciclagens. Setas brancas: Exposição de novos túbulos.

Figura 24. Imagens representativas das alterações no substrato dentinário para o grupo Nano P. A. Dentina na fase inicial; B. Dentina no estágio final. Setas amarelas: Túbulos dentinários obliterados. Setas brancas: Túbulos dentinários ainda expostos.

Figura 25. Imagens representativas das alterações no Grupo solução. A. Dentina na fase inicial; B. Dentina no estágio final. Setas: Obliteração total dos túbulos dentinários.

5. DISCUSSÃO

O principal mecanismo de ação dos agentes dessensibilizantes obliteradores é a obliteração total ou parcial dos túbulos dentinários expostos, com consequente redução da permeabilidade da dentina. Entretanto, a precipitação ou camada formada por esses agentes, pode ser removida ou dissolvida entre ou logo após as aplicações (PETERSSON, 2013). As substâncias ácidas são capazes de remover a camada e expor os túbulos dentinários, (REIS et al., 2008; SAURO et al., 2009) ao mesmo tempo que a saliva pode solubilizar os materiais que aderem aos tecidos dentários (ARRAIS et al., 2003; GANDOLFI et al., 2008).

Um dessensibilizante ideal para o tratamento da hipersensibilidade dentinária (HD) não só precisa reduzir a permeabilidade da dentina, mas também manter o efeito de oclusão frente aos ácidos e a saliva (WANG et al., 2010), sendo que, uma das desvantagens dos tratamentos atuais é o tempo limitado que eles são eficazes (ESTEVES et al., 2016). Portanto, a simulação de fatores etiológicos sob circunstâncias similares ao do ambiente bucal, como desafios erosivos devido a uma dieta ácida, é um procedimento importante para avaliar a estabilidade dos precipitados e consequente eficácia dos agentes dessensibilizantes (WANG et al., 2010; CANALI et al., 2017).

Uma vez que o ácido cítrico é um componente comum de frutas, alimentos industrializados e bebidas que estão presentes na dieta de grande parte da população (LUSSI e HELLWIG, 2014, KITASAKO, 2015) e amplamente utilizado em pesquisas anteriores, sobre mecanismos de erosão de esmalte e dentina, (TURSSI et al., 2011; JOSHI, et al., 2013; SCHLUETER, 2016; CANALI et al., 2017) o ácido cítrico foi selecionado neste estudo a fim de simular episódios erosivos no ambiente bucal e testar, por meio de ciclagens erosivas, a resistência dos agentes dessensibilizantes ao desafio ácido, bem como o efeito dos mesmos no substrato dentinário.

A avaliação *in vitro* da eficácia dos agentes dessensibilizantes de acordo com a literatura (PEREIRA et al., 2005; SAURO et al., 2010; WANG et al., 2010; BANOMYONG et al., 2013; ESTEVES et al., 2016; ISHIHATA et al., 2017; ZHOU et al., 2016; ; CANALI et al., 2017; YILMAZ et al., 2017), pode ser realizada utilizando um sistema de filtração de fluidos para medição da condutância hidráulica, que consiste em forçar um fluido através da dentina, sob determinada pressão (CAMPS et al., 1997). Este método foi desenvolvido por

Reeder et al., 1978, como um modelo para avaliar a capacidade de possíveis agentes dessensibilizantes na redução do fluxo do fluido devido à oclusão dos túbulos dentinários (ZHONG, 2015).

Pashley, em 1990, observou que a condutância hidráulica de um tecido expressa a facilidade com que o fluido pode mover-se através da área de superfície sob uma pressão por unidade de tempo. A condutância hidráulica é determinada por uma série de variáveis, que incluem a pressão movendo o fluido através da dentina, o comprimento dos túbulos dentinários, a viscosidade do fluido e o raio dos túbulos (PASHLEY, 1990).

O fluxo do fluido através dos túbulos deve obedecer à lei de Poiseuille, a qual postula que, o mesmo varia com a quarta potência do raio dos túbulos (MICHELICH, 1978). Markowitz e Pashley (2008) alegam que o fator-chave que determina a condutância hidráulica é o raio do túbulo e que, portanto, pequenas mudanças no raio podem ter um efeito muito grande sobre o fluxo do fluido. Reduzir o raio funcional do túbulo ao ocluí-lo parcialmente, deve reduzir significativamente o fluxo do fluido e, portanto, sua permeabilidade (GREENHILL e PASHLEY, 1981).

A teoria hidrodinâmica (BRANNSTROM, 1967), afirma que os estímulos aplicados aos túbulos dentinários expostos, causam o movimento do fluido tubular dentinário, que por sua vez, estimula os odontoblastos e os nervos aferentes, desencadeando a sensação de dor. Assim, uma substância que conduza a uma diminuição da condutância do fluido dentinário (ou seja, a permeabilidade dentinária), reduzindo o diâmetro ou ocluindo os túbulos e diminuindo seu número, é capaz de reduzir a sintomatologia clínica da HD (MARKOWITZ e PASHLEY, 2008; SAURO et al., 2010; WANG et al., 2010). A mensuração da condutância hidráulica é uma medida conveniente da permeabilidade dentinária. Este modelo funciona bem para agentes que dessensibilizam através da oclusão dos túbulos, mas não é adequado para aqueles que modificam a atividade nervosa (KOLKER, 2002).

No presente estudo, foi avaliada a capacidade de redução da permeabilidade dentinária, através da obliteração dos túbulos dentinários e sua estabilidade, de um agente dessensibilizante comercial e de uma solução experimental de quitosana, após ciclagem erosiva. Para tanto, três mensurações da permeabilidade foram realizadas em momentos distintos: na presença de *smear layer* (permeabilidade mínima), após desafio ácido (permeabilidade máxima) e após os tratamentos e ciclagens erosivas. Devido às divergências

na literatura quanto ao valor da pressão utilizada na mensuração da permeabilidade, os quais variam de 0,5 a 26 psi (PASHLEY et al., 1984; KOLKER et al., 2002; PRATI et al., 2003; PEREIRA et al., 2005; SAURO et al., 2010; SHARMA et al., 2013; THANATVARAKORN et al., 2013; ESTEVES et al., 2016; ISHIATA et al., 2017; CANALI et al., 2017; YILMAZ et al., 2017), a pressão empregada para o estudo em questão foi de 6,5 psi, valor suficiente que proporcionou a movimentação do líquido pelo tubo capilar, possibilitando uma medição precisa em poucos minutos, quando utilizado o sistema de filtração adotado. Valores de pressão muito baixos não são capazes de forçar o fluido através dos túbulos e pressões muito altas não são indicadas, pois pode-se gerar resultados que subestimam a condutância, devido a uma perturbação do conteúdo do túbulo (CAMPS et al., 1997).

A permeabilidade mínima corresponde à permeabilidade de dentes não sensíveis. Foi realizada logo após o polimento das amostras com as lixas #1200 e #2000, mantendo a *smear layer* na face externa dos discos de dentina e com ataque ácido com ácido fosfórico 37% na face pulpar. O intuito foi obter valores mínimos de condutância hidráulica como referência para a interpretação dos dados a respeito da obstrução efetiva dos túbulos dentinários e a redução do fluxo de líquido através da dentina (PEREIRA et al., 2005), pelos agentes dessensibilizantes empregados.

A comparação entre as condições mínimas por tratamento mostrou que os grupos tratados com NP e SE, além de resultarem ao retorno da permeabilidade a valores mínimos, causaram a diminuição significativa desses valores, isso sugere que os tratamentos bloquearam o movimento do fluido dentinário.

Geralmente, a *smear layer* evita o fluxo do fluido devido à formação de *smear plugs*, em que micropartículas produzidas pelo desgaste da dentina, penetram forçadamente por alguns micrômetros no interior do complexo tubular da dentina, selando os túbulos (PASHLEY, 1992; CARRILHO et al., 2007). Contudo, a *smear layer* bloqueia 86% do fluxo do fluido através da dentina (PASHLEY, 1978), permitindo que o líquido dentinário possa penetrar lentamente através dessa camada (PASHLEY E TAY, 2012). Como os agentes dessensibilizantes apresentaram uma diminuição da condutância, supõe-se que o NP e SE obliteraram os túbulos mais efetivamente do que a *smear layer*.

Em relação à permeabilidade máxima, os grupos NP e SE apresentaram uma diminuição significativa nos valores de condutância hidráulica, o que representa a redução da

permeabilidade dentinária. Os valores máximos de permeabilidade foram obtidos logo após o desafio erosivo com ácido cítrico 6% (SHARMA et al., 2013), causando então um tecido dentinário mais permeável e alcançando uma situação laboratorial condizente com a condição clínica da HD (PASHLEY et al., 1984; PEREIRA et al., 2005). Sendo assim, o tratamento das amostras com Nano P e a solução experimental, exerceram um efeito positivo no substrato, como pode ser observado na morfologia do substrato ao final do experimento (Figuras 24 e 25), onde houve diminuição das embocaduras dos túbulos dentinários e até sua obliteração.

Por outro lado, para o grupo controle, onde todas as etapas das ciclagens foram realizadas, mas sem qualquer tratamento, houve um incremento dos valores da permeabilidade como observado na literatura (WANG et al., 2018), em que ação dos agentes ácidos ocasiona maiores danos erosivos, ampliam as embocaduras dos túbulos dentinários e mantém o paciente com sensibilidade.

A comparação entre os grupos para as permeabilidades máxima e mínima mostrou que quando realizada a diferença dos valores de condutância obtidos após a ciclagem e tratamentos em relação à permeabilidade máxima, nos grupos em que foram realizados os tratamentos, NP e SE, houve uma diminuição significativa da permeabilidade dentinária. O mesmo não aconteceu para o grupo controle, onde houve um significativo aumento dos valores de condutância hidráulica após as ciclagens erosivas. Com isso, se reafirma o princípio de que não havendo tratamento, casos de hipersensibilidade se agravam com o tempo e tanto o Nano P quanto a solução experimental foram eficazes na diminuição da permeabilidade dentinária.

O Dessensibilize Nano P tem em sua composição a nano-hidroxiapatita (nHAP), fórmula disponível recentemente que se baseia na nanotecnologia, fornecendo nanocristais de hidroxiapatita que causam a oclusão tubular (ORSINI et al., 2010). A Hidroxiapatita em nanopartículas pode penetrar nas porosidades dos dentes e produzir uma camada protetora semelhante ao dente natural (COCHRANE et al, 2010; HUANG et al, 2011). O efeito dessensibilizador dos cristais de nHAP é devido a obliteração dos túbulos dentinários, com a formação de “plugs” de HA e regeneração de uma camada mineralizada (ORSINI et al., 2010).

A hidroxiapatita (HA) é o principal componente inorgânico dos tecidos biológicos mineralizados (ANAND, 2017). Materiais que contêm a HA, principal constituinte da fase

inorgânica do dente, podem ser capazes de proporcionar íons cálcio e fosfato que auxiliam na remineralização dos dentes. É considerada um dos materiais mais biocompatíveis e bioativos, devido à sua semelhança com a composição mineral dental (GOPINATH et al., 2015) e evidências demonstram que suas partículas possuem morfologia, estrutura e cristalinidade semelhantes a apatita dental (VANDIVER et al., 2005). Estudos in vitro evidenciam a capacidade de indução da remineralização em casos de perda de estrutura dental frente a episódios erosivos e em lesões iniciais de cárie, formando um revestimento de apatita biomimética na superfície do esmalte e da dentina, o que ocorre devido às características químico-físicas da HA (HUANG et al., 2010; HUANG et al., 2011; NAJIBFARD et al., 2011; GOPINATH et al., 2015).

No presente estudo, a pasta Nano P foi o controle positivo para comparar a eficácia da solução experimental desenvolvida em que verificou-se a diminuição da permeabilidade, evidenciada através dos achados morfológicos que apresentaram uma dentina intertubular mais densa e diminuição das embocaduras dos túbulos dentinários. Assim, esses achados corroboram com pesquisas anteriores, em que houve diminuição da HD para tratamentos com a nano-hidroxiapatita (VANO et al., 2014; GOPINATH et al., 2015; WANG et al., 2016; VANO et al., 2018),

Por sua vez, a solução experimental de quitosana também apresentou resultados satisfatórios para todas as análises, diminuindo os valores de condutância hidráulica e, portanto, diminuindo a permeabilidade da dentina. Em concordância com esses achados, estudos que investigaram o efeito da quitosana na dentina, obtiveram resultados positivos quanto à diminuição da permeabilidade dentinária e obliteração dos túbulos dentinários (SANCHES, 2017), além da nucleação de cristais na superfície da dentina melhorando assim, a remineralização por deposição de íons de cálcio e fosfato em superfícies desmineralizadas (XU et al., 2011). Esse biopolímero hidrofílico com grande número de grupos hidroxilo e amino livres tem sido usado para numerosas modificações químicas (SHERESTHA et al., 2014). Sendo uma propriedade importante da quitosana, a capacidade de veiculação e entrega para locais alvo, o que também pode explicar o efeito positivo na dentina, diminuindo sua permeabilidade.

Estudos mostram que os grupos reativos livres na quitosana podem interferir e formar ligações químicas com colágeno (MADHAVAN et al., 2010; WANG et al., 2003). O colágeno dentinário incorporado e reticulado com a quitosana exibe propriedades mecânicas

superiores em relação à ligação cruzada apenas entre colágeno, maior resistência à degradação pela colagenase bacteriana (SHRESTHA et al., 2011; FAWZY et al., 2013) e, além disso, as partículas de quitosana inibem a aderência bacteriana na dentina (KISHEN et al., 2008). Kishen e colaboradores, em 2016, sugeriram que o tratamento da dentina com a quitosana antes de qualquer procedimento endodôntico ou restaurador pode melhorar a resistência do colágeno superficial da dentina à degradação bacteriana, devido à interação específica da quitosana com matriz de colágeno e a enzima colagenase.

Além dos resultados positivos na permeabilidade dentinária, verificou-se em relação ao teste de microtração, que o grupo SE, não influenciou na resistência de união de restaurações de resina composta. Esses achados sugerem que seria de grande valia a utilização da solução experimental anteriormente ao procedimento restaurador, obliterando os túbulos e prevenindo uma possível sensibilidade pós-operatória, situação rotineira encontrada na prática clínica (YANG et al., 2014).

A dentina é composta por uma matriz extracelular formada principalmente por colágeno tipo I infiltrado em um componente mineral inorgânico. Após o colágeno ser sintetizado, a reticulação mediada pela lisil oxidase, estabiliza as fibrilas de colágeno através da ligação covalente inter e intra-molecular (BUTLER et al., 1995). Essa reticulação endógena melhora as propriedades mecânicas da matriz de colágeno e proporciona resistência contra a degradação enzimática. A indução de ligações cruzadas por agentes extrínsecos pode levar a formação adicional de reticulações e melhorar a resistência mecânica da matriz de colágeno (SUNG et al., 2003; BEDRAN-RUSSO et al., 2007; WALTER et al., 2008; AL-AMMAR et al., 2009; HIRAISHI et al., 2013).

Os resultados encontrados no presente estudo suportam a capacidade de certos reticulantes de colágeno na melhora das propriedades da dentina, aumentando assim as propriedades da interface adesiva e da camada híbrida (AL-AMMAR et al., 2009). O genipin pode reagir com grupos amino livres de lisina, hidroxilisina ou arginina para formar ligações cruzadas intra ou intermoleculares dentro de uma molécula de colágeno ou entre moléculas de colágeno adjacentes (SUNG et al., 2003; AL-AMMAR et al., 2009). É possível que ação do genipin como formador de ligação cruzada do colágeno, tenha causado um efeito positivo na camada híbrida, conferindo maior resistência e possibilitando a alta porcentagem de fraturas do tipo coesiva-dentina, no grupo SE.

O processo de adesão à dentina ocorre através de um mecanismo micromecânico com a formação de uma camada híbrida (NAKABAYASHI e PASHLEY, 1998). A impregnação do substrato dentinário por monômeros ocasiona a formação de uma camada híbrida compacta e homogênea, que depende fortemente da estabilidade da interface adesiva (VAN MEERBEEK et al., 1993). Ao mesmo tempo em que a camada híbrida é essencial para a ligação dentinária, é também o componente mais fraco e vulnerável da interface (AL-AMMAR et al., 2009).

A camada híbrida está sujeita a degradação enzimática. A degradação do colágeno pelas MMPs não só diminui a resistência de união entre dentina e resina, mas também aumenta lentamente a permeabilidade dentinária ao liberar os “tags” de resina, destruindo a camada híbrida (ABU-NAWAREG et al., 2015). As atividades das MMPs são iniciadas com a redução do pH seguido da sua neutralização. No estudo em questão, foram realizadas três exposições das amostras ao ácido cítrico (pH 1,2) seguido por imersão na saliva nos intervalos entre as exposições. É provável que o baixo pH do ácido durante a ciclagem erosiva seguido da sua neutralização, tenha induzido a atividade de degradação da matriz orgânica pelas MMPs derivadas da dentina (TJADERHANE et al., 1998). Os achados do teste de microtração reforçam as propriedades inibitórias das MMPs pelo EGCG, outro componente da solução experimental.

O extrato do chá verde (EGCG) foi inserido na composição da solução, devido a suas propriedades já reladas por outros estudos quanto à inibição das metaloproteinases (MMPs). O EGCG parece exibir uma ligação por pontes de hidrogênio e interação hidrofóbica com as collagenases, o que seria responsável pela alteração na estrutura secundária das mesmas (MADHAN et al., 2007; KATO et al., 2009).

Diferente dos grupos SE e NP, não foi realizado nenhum tratamento com agente dessensibilizante nas amostras do grupo controle, onde foi somente realizado o protocolo restaurador utilizando um sistema adesivo autocondicionante, sistema também utilizado nas restaurações dos grupos NP e SE. O grupo controle alcançou o maior valor de resistência de união. Valores semelhantes também foram encontrados em outros estudos (MCLEOD et al., 2010).

A aplicação do Dessensibilize Nano P anteriormente à restauração resultou em uma diminuição dos valores em relação ao grupo controle. Apesar de ocorrer a redução da

desmineralização e aumento da remineralização da dentina, mantendo uma alta concentração de fosfato de cálcio na superfície dentinária, isso pode ter ocasionado a formação de uma barreira, evitando o condicionamento efetivo da estrutura da dentina e reduzindo assim a resistência de união (CORTIANO, 2016).

Quando realizada a análise morfológica, percebe-se que no grupo NP há uma remineralização do substrato dentinário, principalmente na dentina inter e peritubular, causando a diminuição do diâmetro dos túbulos dentinários. Pela análise quantitativa, o Dessensibilize Nano P causou uma diminuição significativa do número e da área dos túbulos. Esse material, que consiste em cristais de fosfato de cálcio nanométrico, resultou em um padrão heterogêneo de obliteração, com base na visualização de túbulos abertos e parcialmente ou totalmente obliterados pelos precipitados, padrão também observado por Canali e colaboradores, em 2017. Os autores (CANALI et al. 2017) sugerem que os ciclos erosivos interferiram na ação do produto. Sendo assim, em se tratando de um produto obliterador para o controle da hipersensibilidade dentinária, o Nano P não obteve uma ação eficaz e duradoura frente aos desafios ácidos, visto que, a grande maioria dos túbulos continuou exposta.

Quanto ao grupo tratado com a solução experimental de quitosana, houve uma redução significativa do número dos túbulos dentinário expostos, em relação aos grupos controle e NanoP, com obliteração total observada nas imagens de microscopia confocal a laser.

A reticulação da quitosana pelo genipin exhibe uma melhora das suas características físico-mecânicas (VARONI et al., 2017). O mecanismo de reticulação é uma reação química entre o grupo NH₂ (amino) na quitosana e o grupo COO (éster) no genipin, resultando na formação de um grupo amida (CHEN et al., 2018). Essa estabilidade conferida a quitosana pode explicar a permanência da obliteração dos túbulos dentinários mesmo após a ciclagem erosiva, como pode-se observar na figura 25.

O efeito positivo da solução no substrato, também pode ser relacionado ao efeito protetor do EGCG. Supõe-se que o EGCG se liga aos íons cálcio para produzir certos precipitados resistentes a ácidos que são efetivos na supressão da erosão, exercendo uma proteção do substrato e reduzindo os danos e a progressão da perda de estrutura, podendo também causar a diminuição do diâmetro dos túbulos dentinários (WANG et al., 2018). Além disso, há a possibilidade da inibição das metaloproteinases, reduzindo os danos causados a

dentina (MAGALHÃES et al, 2009; KATO et al., 2009). É possível notar pela figura 25, a preservação da estrutura, quando se compara ao grupo controle (Figura 23).

Para o grupo controle houve um aumento significativo do número e do perímetro dos túbulos dentinários. Devido ao alto teor de matéria orgânica na dentina, a difusão do agente ácido nas regiões mais profundas é dificultada pela matriz dentinária, assim como o fluxo externo do mineral dissolvido do dente (HARA et al., 2005). No entanto, uma vez que essa matriz é degradada por produtos químicos, a desmineralização seguirá (GANSS et al., 2004). Como no grupo controle não foi realizado nenhum tratamento dessensibilizante obliterador ou que dificultasse a progressão erosiva, a dentina peritubular e intertubular sofreram intensa degradação, resultando em túbulos mais amplos após a ciclagem erosiva.

Diante do exposto, torna-se importante a realização do tratamento e controle da HD por agentes dessensibilizantes que formem precipitados e camadas estáveis na obliteração dos túbulos, visto que os tratamentos auxiliaram na manutenção e preservação da estrutura da dentina. Em casos de exposição da dentina que envolvam maiores perdas de estrutura, necessitando a associação de um tratamento restaurador, formulações de dessensibilizantes que não influenciem na adesividade à dentina e ao mesmo tempo favoreçam o aumento da resistência de união tornam-se interessantes. No presente estudo os agentes naturais (quitosana; EGCG; Genipin), conferiram à solução experimental desenvolvida essa ação mais estável e uma influência positiva no substrato dentinário, com a vantagem de possuírem baixa toxicidade, visto que ótimos resultados foram obtidos acerca da diminuição da permeabilidade e oclusão dos túbulos, mesmo após os desafios erosivos, sem interferir no processo adesivo. Entretanto, são necessários outros estudos, inclusive o desenvolvimento de pesquisas clínicas, uma vez que, até o momento não existam relatos da associação desses agentes para fins de tratamento da hipersensibilidade dentinária.

6. CONCLUSÃO

Considerando as limitações deste estudo, pode-se concluir que:

1. A solução experimental de quitosana foi eficaz na diminuição da permeabilidade dentinária. Apresentou os melhores resultados na oclusão dos túbulos dentinários e na estabilidade das obliterações frente aos desafios erosivos e não influenciou na resistência de união de restaurações em resina composta.
2. A frequente exposição aos ácidos sem a realização de um tratamento dessensibilizante obliterador, aumentou a permeabilidade e a erosão da dentina.

7. REFERÊNCIAS

- ABU-NAWAREG, M. M. et al. Adhesive sealing of dentin surfaces in vitro: a review. *American journal of dentistry*, v. 28, n. 6, p. 321, 2015.
- ADDY, M. Dentine hypersensitivity: new perspectives on an old problem. *International Dental Journal*, v. 52(Suppl), p. 367–375, 2002.
- ADDY, M. Etiology and clinical implications of dentine hypersensitivity. *Dental Clinics of North America*, v. 34, p. 503-14. 1990.
- AKCA, T. et al. The effect of desensitizing treatments on the bond strength of resin composite to dentin mediated by a self-etching primer. *Operative Dentistry*, v. 32, p. 451–456, 2007.
- AL-AMMAR, A.; DRUMMOND, J. L.; BEDRAN-RUSSO, A. K. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 91, n. 1, p. 419-424, 2009.
- AMAECHI, B. T.; HIGHAM, S. M.; EDGAR, W. M. Techniques for production of dental eroded lesions in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 26, p. 97-102, 1999.
- ANAND, S. et al. Comparative Evaluation of Effect of Nano-hydroxyapatite and 8% Arginine Containing Toothpastes in Managing Dentin Hypersensitivity: Double Blind Randomized Clinical Trial. *Acta medica (Hradec Kralove)*, v. 60, n. 3, p. 114-119, 2017.
- ARISU, H. D.; DALIKHC, E.; UCTASLI, M. B. Effect of desensitizing agents on the microtensile bond strength of a two-step selfetch adhesive to dentin. *Operative Dentistry*, v. 36, p. 153–161, 2011.
- ARRAIS, C. A. G. et al. Occluding effect of dentifrices on dentinal tubules. *Journal of dentistry*, v. 31, n. 8, p. 577-584, 2003.
- BAE, J. Y. et al. Epigallocatechingallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated proteinkinase. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 1298–1307, 2008.
- BANOMYONG, D.; KANCHANASANTIKUL, P.; WONG, R. H. Effects of casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate remineralizing paste and 8% arginine desensitizing paste on dentin permeability. *Journal of investigative and clinical dentistry*, v. 4, n. 3, p. 200-206, 2013.
- BASEGGIO, W. et al. Effect of deproteinization and tubular occlusion on microtensile bond strength and marginal microleakage of resin composite restorations. *Journal of Applied Oral Science*, v. 17, p. 462–466, 2009.
- BEDRAN-RUSSO, A. K. B. et al. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 80, n. 1, p. 268-272, 2007.
- BEKES, K. & HIRSCH, C. What is known about the influence of dentine. *Supplement 1*, p. 45 -51, 2013.

BRÄNNSTRÖM, M.; ÅSTRÖM, A. A study on the mechanism of pain elicited from the dentin. *Journal of dental research*, v. 43, n. 4, p. 619-625, 1964.

BRANNSTROM, M.L.; LINDEN, A.; STROM, A.: The Hydrodynamics of Dentin and Pulp Fluid: Its Significance in Relation to Dental Pain, *Caries Research* 1:310-317, 1967.
BUTLER, William T. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connective tissue research*, v. 33, n. 1-3, p. 59-65, 1995

BRANNSTROM, M. A hydrodynamic mechanism in the transmission of pain-producing stimuli through dentine In: ANDERSON, D.J. *Sensory Mechanisms in Dentine: Proceedings of a Symposium*, p. 73-78, 1963.

BUZALAF, M. A. R.; KATO, M. T.; HANNAS, A. R. The Role of Matrix Metalloproteinases in Dental Erosion. *Advances in Dental Research*, v. 24, n.2, p. 72 – 76, 2012.

CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMENEZ, R. Beneficial effects of green tea – a
CAMPS, J. et al. Low versus high pressure for in vitro determination of hydraulic conductance of human dentine. *Archives of oral biology*, v. 42, n. 4, p. 293-298, 1997.

CANALI, G. D. et al. Effect of Erosion/Abrasion Challenge on the Dentin Tubule Occlusion Using Different Desensitizing Agents. *Brazilian dental journal*, v. 28, n. 2, p. 216-224, 2017.

CARRILHO, M. R. et al. Dentine sealing provided by smear layer/smear plugs vs. adhesive resins/resin tags. *European journal of oral sciences*, v. 115, n. 4, p. 321-329, 2007.

CHABANSKI, M. B.; GILLIAM, D. G.; BULMAN, J. S.; NEWMAN, H. N. Prevalence of cervical dentine sensitivity in a population of patients referred to a specialist periodontology department. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 23, p. 989-92. 1996. 85, n. 1, p. 22 - 32. 2006.

CHAUSSAIN-MILLER, C. et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *Journal of Dental Research*, v. 85, n. 1, p. 22 – 32, 2006.

CHEN, J. et al. Macrophage Phenotype Switch by Sequential Action of Immunomodulatory Cytokines from Hydrogel Layers on Titania Nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018.

CHUAJEDONG, P. et al. Associated factors of tooth wear in southern. *Journal of Oral Rehabilitation, Thailand*, v. 29, n. 10, p. 997-1002, oct. 2002.

COCHRANE, N. J. et al. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *Journal of dental research*, v. 89, n. 11, p. 1187-1197, 2010

CORTIANO, F. M. et al. Effect of desensitizing agents on the microtensile bond strength of two- step etch-and-rinse adhesives to dentin. *European journal of oral sciences*, v. 124, n. 3, p. 309-315, 2016.

CUMMINS, D. Recent advances in dentin hypersensitivity: clinically proven treatments for instant and lasting sensitivity relief. *American Journal of Dentistry*; v. 23, p. 3A -13A, 2010.

CURRO, F. A. Tooth hypersensitivity in the spectrum of pain. *Dental Clinics of North America*, v. 34: 429-37, 1990.

DAVARI, A.R.; ATAIEI, E.; ASSARZADEH H. Dentin hypersensitivity: etiology, diagnosis

and treatment; a literature review. *Journal of Dentistry*, Shiraz University of Medical Sciences, v. 14, n. 3, p. 136-45, 2013.

DE ANDRADE, E. et al. Effect of oxalate desensitizer on the durability of resinbonded interfaces. *Operative Dentistry*, v. 35, p. 610–617, 2010.

DEMEULE, M. et al. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochimica BiophysicaActa*, v.1478, p. 51-60, 2000.

DEMORAES PORTO, I. C. et al. Effect of dentin pretreatment with potassium oxalate: Analysis of microtensile bond strengths and morphologic aspects. *Microscopy Research and Technique*, v. 75, p. 239–244, 2012.

ESTEVES, S. R. M. S. et al. Longitudinal effect of surface treatments modified by NaOCl-induced deproteinization and Nd: yag laser on dentin permeability. *Photomedicine and laser surgery*, v. 34, n. 2, p. 68-75, 2016.

FARAONI, J. J. et al. Efficacy of different strategies to treat root dentin eroded by liquid or gaseous hydrochloric acid associated with brushing abrasion. *Archives of oral biology*, 2018.

FAWZY, A. S. et al. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. *journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v. 17, p. 278-289, 2013.

FAWZY, A. S. et al. Riboflavin as a dentin crosslinking agent: ultraviolet A versus bluelight. *Dental Materials*, v. 28, p. 1284–91, 2012.

FISCHER, C.; FISCHER, R. G.; WENNBERG, A. Prevalence and distribution of cervical dentine hypersensitivity in a population in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dentistry*, v. 20, n. 5, p. 272-276, 1992.

FLYNN, J.; GALLOWAY, R.; ORCHARDSON, R. The incidence of “hypersensitive” teeth in the West of Scotland. *Journal of Dentistry*, v. 13, p. 230-6, 1985.

GANDOLFI, M. G. et al. Calcium silicate coating derived from Portland cement as treatment for hypersensitive dentine. *Journal of dentistry*, v. 36, n. 8, p. 565-578, 2008.

GANSS, C. et al. Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. *European Journal of Oral Science*, v. 117, n. 3, p. 255–260, 2009.

GANSS, C. et al. Effects of toothbrushing on eroded dentine. *European Journal of Oral Science*, v. 115, n. 5, p. 390–396, 2007.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; STARCK, C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Archives of oral biology*, v. 49, n. 11, p. 931-935, 2004.

GOPINATH, N. M. et al. Evaluation of dentifrice containing nano-hydroxyapatite for dentinal hypersensitivity: A randomized controlled trial. *Journal of international oral health: JIOH*, v. 7, n. 8, p. 118, 2015.

GREENHILL J. D.; PASHLEY D. H. The effects of desensitizing agents on the hydraulic conductance of human dentin, in vitro. *J. dent. Res.* 60, 686-698, 1981.

GRIPPO, J. O.; CHAIYABUTR, Y.; KOIS, J. C. Effects of Cyclic Fatigue Stress-Biocorrosion on Noncarious Cervical Lesions. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v. 25(4), p. 265–272, 2013.

GRIPPO, J. O.; SIMRING, M.; THOMAS, A. C. Abfraction, Abrasion, Biocorrosion, and the Enigma of Noncarious Cervical Lesions: A 20-Year Perspective. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, n. 24, p. 10 – 25, 2012.

HANNAS, A. R. et al. Preventive effect of toothpastes with MMP inhibitors on human dentine erosion and abrasion in vitro. *Journal of Applied Oral Science*, v. 24, n.1, p. 61-66, 2016.

HARA, A. T. et al. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries research*, v. 39, n. 2, p. 134-138, 2005.

HIRAISHI, N. et al. In vitro evaluation of plant-derived agents to preserve dentin collagen. *Dental Materials*, v. 29, n. 10, p. 1048-1054, 2013.

HOLLAND, G. R. et al. Guidelines for the design and conduct of clinical trials on dentine hypersensitivity. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 24, p. 808-13, 1997.

HUANG, S. et al. Combined effects of nano-hydroxyapatite and *Galla chinensis* on remineralisation of initial enamel lesion in vitro. *Journal of dentistry*, v. 38, n. 10, p. 811-819, 2010.

HUANG, S. et al. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. *Caries research*, v. 45, n. 5, p. 460-468, 2011.

HUYSMANS, M.C.; CHEW, H.P.; ELLWOOD, R.P.: Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Research*, v. 45(Suppl 1), p. 60 – 68, 2011.

INGMAN, T. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodon-titis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 23, n. 12, p. 1127 – 1132, dec, 1996.

ISHIHATA, H. et al. Effect of two desensitizing agents on dentin permeability in vitro. *Journal of Applied Oral Science*, v. 25, n. 1, p. 34-41, 2017.

JAEGGI, T.; LUSSI, A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monographs in Oral Science*, v. 20, p. 44-65, 2006.

JOSHI, S.; GOWDA, A. S.; JOSHI, C. Comparative evaluation of NovaMin desensitizer and Gluma desensitizer on dentinal tubule occlusion: a scanning electron microscopic study. *Journal of periodontal & implant science*, v. 43, n. 6, p. 269-275, 2013.

KATO, M. T. et al. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *Journal of Applied Oral Science*, v. 17, n. 6, p. 560-564, 2009.

- KATO, M. T. et al. Activity of MMPs in bovine versus human dentine. *Caries Research*, v. 45, p. 429-434, 2011.
- KATO, M. T. et al. Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. *Caries Research*, v. 44, p. 309–316, 2010.
- KAWASAKI, A. et al. Effects of plaque control on the patency and occlusion of dentine tubules in situ. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 28, p. 439-49, 2001.
- KISHEN, A. et al. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *Journal of endodontics*, v. 34, n. 12, p. 1515-1520, 2008.
- KISHEN, A. et al. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dental Materials*, v. 32, n. 8, p. 968- 977, 2016.
- KISHEN, AS. A. Nanotechnology in endodontics current and potential clinical applications. Springer Science + BusinessMedia, 2015.
- KITASAKO, Y et al. Age-specific prevalence of erosive tooth wear by acidic diet and gastroesophageal reflux in Japan. *Journal of dentistry*, v. 43, n. 4, p. 418-423, 2015.
- KLETER, G. A. et al. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *Journal of Dental Research*, v. 73, n.9, p. 1523–1529, 1994.
- KLONT, B.; TEN CATE, J. M. Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix. *Caries Research*, v. 25, n. 1, p. 39–45, 1991.
- KOLKER, J. L. et al. Effect of desensitizing agents on dentin permeability and dentin tubule occlusion. *The Journal of Adhesive Dentistry*, v. 4, n. 3, p. 211- 221, 2002.
- KREULEN, C. M. et al. Systematic review of the prevalence of tooth wear in children and adolescents. *Caries Research*, v. 44, n. 2, p.151–159, 2010.
- LIU, H. C.; LAN, W. H.; HSIEH, C. C. Prevalence and distribution of cervical dentin hypersensitivity in a population in Taipei, Taiwan. *Journal of Endodontics*, v. 24, p. 45-7, 1998.
- LUSSI, A. Erosive tooth wear a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monographs in Oral Science*, v.20, p. 1 – 8, 2006a.
- LUSSI, A. et al. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *American Journal of Dentistry*, v. 19(6), p. 319- 25, 2006b
- LUSSI, A.; HELLWIG, E. Foreword. *Clinical Oral Investigations*, v. 17, Suppl 1, p. S1– S2, 2013.
- LUSSI, A.; HELLWIG, E. Risk assessment and causal preventive measures. In: *Erosive Tooth Wear*. Karger Publishers, p. 220-229, 2014.

LUSSI, A.; JAEGGI, T.; ZERO, D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries research*, n. 38 (Suppl 1), p. 34-44, 2004.

MADHAN, B. et al. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *International journal of biological macromolecules*, v. 41, n. 1, p. 16-22, 2007.

MADHAVAN, K. et al. Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta biomaterialia*, v. 6, n. 4, p. 1413-1422, 2010.

MAGALHÃES, A. C. et al. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *Journal of dentistry*, v. 37, n. 12, p. 994-998, 2009.

MANTZOURANI, M. & SHARMA, D. Dentine sensitivity: past, present and future. *Journal of Dentistry*, v. 41, Supplement 4, p. 3-17, 2013.

MARKOWITZ, K.; PASHLEY, D. H.. Discovering new treatments for sensitive teeth: the long path from biology to therapy. *Journal of oral rehabilitation*, v. 35, n. 4, p. 300-315, 2008.

MARTIN-DE LAS HERAS, S.; VALENZUELA, A.; OVERALL, C. M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Archives of Oral Biology*, v. 45, n. 9, p. 757-765, 2000.

MAZZONI, A. et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *Journal of dentistry*, v. 39, n. 3, p. 231-237, 2011.

MAZZONI, A. et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: Correlative FEI-SEM/TEM analysis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 88, n. 3, p. 697-703, 2009.

MCLEOD, M. E.; PRICE, R. B. T.; FELIX, C. M. Effect of configuration factor on shear bond strengths of self-etch adhesive systems to ground enamel and dentin. *Operative dentistry*, v. 35, n. 1, p. 84-93, 2010.

MEURMAN, J. H.; DRYSDALE, T.; FRANK, R. M. Experimental erosion of dentin. *Scand Journal of Dental Research*, v. 99, n. 6, p. 457-462, 1991.

MI, F. L. et al. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co crosslinked chitosan gel beads. *Polymer*, v. 44, p. 6521 – 6530. 2003.

MICHELICH, V.; PASHLEY, D. H.; WHITFORD, G. M. Dentin permeability: a comparison of functional versus anatomical tubular radii. *Journal of dental research*, v. 57, n. 11-12, p. 1019- 1024, 1978.

MIRKARIMIL, M.; TOOMARIAN, L. Effect of Green Tea Extract on the Treatment of Dentin Erosion: An in Vitro Study. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences*, v. 9, n. 4, p. 224-228, 2012.

MOSLEMI, M. et al. Epidemiology of dental erosion in 14-17-year-old girls in Ghazvin; 2004. *Journal of Dental Sciences*, v. 26, n.1, p. 73-78, 2008.

- MURRAY, L. E.; ROBERTS, A. J. The prevalence of self-reported hypersensitive teeth. *Archives of Oral Biology*, v. 39(Suppl), p. 129, 1994.
- MUZZARELLI, R. A. A. et al. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. *Marine drugs*, v. 13, n. 12, p. 7314-7338, 2015.
- MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical AIDS. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 1-9, 2009.
- NAGAOKA, H. et al. Characterization of genipin-modified dentin collagen. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.
- NAHÁS PIRES CORRÊA, M. S. et al. Prevalence and associated factors of dental erosion in children and adolescents of a private dental practice. *International Journal of Paediatric Dentistry*, v. 21, n. 6, p. 451-458, 2011.
- NAJIBFARD, K. et al. Remineralization of early caries by a nano-hydroxyapatite dentifrice. *Journal of Clinical Dentistry*, v. 22, n. 5, p. 139, 2011.
- NAKABAYASHI, N.; PASHLEY, D. H. *Hybridization of Dental Hard Tissues*. Tokyo, Japan: Quintessence, p. 64-68, 1998.
- OH, D. S. History, Prevalence, and Etiology of NCCLs and CDH. In: SOARES, P. V.; GRIPPO, J. O. *Noncarious Cervical Lesions and Cervical Dentin Hypersensitivity: etiology, diagnosis and treatment*. Quintessence Publishing Co Inc, p. 10, 2017.
- ORCHARDSON, R.; COLLINS, W. J. Clinical features of hypersensitive teeth. *British Dental Journal*, v. 162, p. 253-6, 1987.
- ORCHARDSON, R.; GILLIAM, D. G. Managing dentin hypersensitivity. *Journal of the American Dental Association*, v. 137, p. 990-8, 2006.
- ORSINI, G. et al. A double-blind randomized-controlled trial comparing the desensitizing efficacy of a new dentifrice containing carbonate/hydroxyapatite nanocrystals and a sodium fluoride/potassium nitrate dentifrice. *Journal of clinical periodontology*, v. 37, n. 6, p. 510-517, 2010.
- PASHLEY D. Dentin permeability: Theory and practice. *Experimental Endodontics*. Boca Raton, FL: CRC Press, P. 19 – 49, 1990. PASHLEY, D. H. et al. Dentin permeability: Effects of desensitizing dentifrices in vitro. *Journal of periodontology*, v. 55, n. 9, p. 522-525, 1984.
- PASHLEY, D. H. Smear layer: Overview of structure and function. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran Toimituksia*, v. 88, p. 215-224, 1992
- PASHLEY, D. H.; LIVINGSTON, M. J.; GREENHILL, J. D. Regional resistances to fluid flow in human dentine in vitro. *Archives of Oral Biology*, v. 23, n. 9, p. 807-810, 1978.
- PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Pulpodentin complex, In: HARGREAVES, K. M., GOODISH, TAY FR, editors. *Seltzer and Bender's dental pulp*, 2nd ed. Chicago: Quintessence Publishing Co; p.47-66, 2012.

PEREIRA, J. C.; SEGALA, A. D.; GILLAM, D. G. Effect of desensitizing agents on the hydraulic conductance of human dentin subjected to different surface pre- treatments-an in vitro study. *Dental Materials*, v. 21, n. 2, p. 129-138, 2005.

PETERSSON, L. G. The role of fluoride in the preventive management of dentin hypersensitivity and root caries. *Clinical oral investigations*, v. 17, n. 1, p. 63-71, 2013.

PRATI, C. et al. Permeability and morphology of dentin after erosion induced by acidic drinks. *Journal of periodontology*, v. 74, n. 4, p. 428-436, 2003.

QUE, K. et al. A multi-centre and cross-sectional study of dentine hypersensitivity in China. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 37, p. 631-7, 2010.

RAAFAT, D.; SAHL, H-G. Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microbial biotechnology*, v. 2, n. 2, p. 186-201, 2009.

REEDER, O. W. Jr. et. al. Dentin permeability: determinants of hydraulic conductance. *Journal of Dental Research*, v. 57, n. 2, p. 187- 193. Fev, 1978.

REIS, C. et al. Strong effect on dentin after the use of high concentrations of citric acid: na assessment with co-site optical microscopy and ESEM. *Dental Materials*, v. 24, n. 12, p. 1608-1615, 2008.

SAHEBI, S.; MOAZAMI, F.; ABBOTT, P. The effects of short-term calcium hydroxide application on the strength of dentine. *Dental Traumatology*. v. 26, p. 43–6, 2010.

SANCHES, J. O. Efeito dos tratamentos dessensibilizantes na evolução de lesões erosivas em dentina. 2017. 104p. Tese (Doutorado).

SANCHES, J.O.; FARAONI-ROMANO, J. J.; PALMA-DIBB, R. G. Influence of Desensitizing Treatments on the Dentinal Tubules During Erosion. *Journal of Dental Research*, 95 (Spec Iss A):1385, 2016.

SANTIAGO, S. L.; PEREIRA, J. C.; MARTINELLI, A. C. Effect of commercially available and experimental potassium oxalate-based dentin desensitizing agents in dentin permeability: influence of time and filtration system. *Brazilian Dental Journal*. v.17, n. 4, p. 300- 305, 2006.

SANTOS, J. et al. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *Journal of Endodontics*, v.35, p. 686-689, 2009.

SAURO, S.; WATSON, T. F.; T, Ian. Dentine desensitization induced by prophylactic and air- polishing procedures: an in vitro dentine permeability and confocal microscopy study. *Journal of dentistry*, v. 38, n. 5, p. 411-422, 2010.

SCHLUETER, N.; JUNG, K.; GANSS, C. Profilometric quantification of erosive tissue loss in dentine: a systematic evaluation of the method. *Caries research*, v. 50, n. 5, p. 443-454, 2016.

SHAFIEI, F. et al. The effect of oxalate desensitizers on the microleakage of resin composite restorations bonded by etch and rinse adhesive system. *Operative Dentistry*, v. 35, p. 682–688, 2010.

SHARMA, D.; HONG, C. X.; HEIPP, P. S. A novel potassium oxalate- containing tooth-desensitising mouthrinse: a comparative in vitro study. *Journal of dentistry*, v. 41, p. S18-S27, 2013.

SHRESTHA, A.; HAMBLIN, M R.; KISHEN, A. Photoactivated rose bengal functionalized chitosan nanoparticles produce antibacterial/biofilm activity and stabilize dentin-collagen. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 10, n. 3, p. 491-501, 2014.

SHRESTHA, A.; FRIEDMAN, S.; KISHEN, A. Photodynamically crosslinked and chitosan-incorporated dentin collagen. *Journal of dental research*, v. 90, n. 11, p. 1346-1351, 2011.

SILVEIRA, C. et al. Anacardic acid from Brazilian Cashew nut trees reduces dentine erosion. *Caries research*, v. 48, n. 6, p. 549-556, 2014.

SOARES, P. V. et al. Loading and composite restoration assessment of various non-carious cervical lesions morphologies - 3D finite element analysis. *Australian Dental Journal*, v. 60, n.3, p 309-316, 2015.

STRASSLER, H. E.; DRISKO, C. L.; ALEXANDER, D. C. Dentine hypersensitivity: its inter-relationship to gingival recession and acid erosion. Newtown, Aegis Publications, 2008.

SU, J. M.; TSAMTSOURIS, A.; LASKOU, M. Gastroesophageal reflux in children with cerebral palsy and its relationship to erosion of primary and permanent teeth. *Journal of the Massachusetts Dental Society*, v. 52, p. 20 – 24, 2003.

SULKALA, M. et al. Matrixmetalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Archives Oral Biology*, v. 52, n. 2, p. 121–127, 2007.

SUNG, H-W. et al. Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *Journal of biomedical materials research Part A*, v. 64, n. 3, p. 427-438, 2003.

TAGAMI, J. et al. Effect of aging and caries on dentin permeability. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia*, v. 88, p.149-154, 1992.

TAY, F. R. et al. Integrating oxalate desensitizers with total-etch twostep adhesive. *Journal of Dental Research*, v. 82, p. 703–707, 2003.

TERSARIOL, I. L. et al. Cysteine cathepsins in human dentin–pulp complex. *Journal of Endodontics*, v. 36, p. 475–81, 2010.

THANATVARAKORN, O. et al. In vitro evaluation of dentinal hydraulic conductance and tubule sealing by a novel calcium-phosphate desensitizer. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 101, n.2, p. 303- 309, fev, 2013.

TJADERHANE, L. et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dental Materials*, v. 29, n. 1, p. 116–135, 2013.

TJÄDERHANE, L. et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *Journal of dental research*, v. 77, n. 8, p. 1622-1629, 1998.

TSCHOPPE, P. et al. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *Journal of Dentistry*, v. 39, n. 6, p. 430-7, 2011.

TURSSI, C. P. et al. Effect of potential remineralizing agents on acid softened enamel. *American journal of dentistry*, v. 24, n. 3, p. 165, 2011.

VACHIRAMON, V. et al. Effects of oxalate on dentin bond after 3-month simulated pulpal pressure. *Journal of Dentistry*, v. 36, p. 178–185, 2008.

VAN MEERBEEK, B. et al. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *Journal of Dental Research*, v. 72, n. 2, p. 495-501, 1993.

VANDIVER, J. et al. Nanoscale variation in surface charge of synthetic hydroxyapatite detected by chemically and spatially specific high-resolution force spectroscopy. *Biomaterials*, v. 26, n. 3, p. 271-283, 2005.

VANO, M. et al. Effectiveness of nano-hydroxyapatite toothpaste in reducing dentin hypersensitivity: a double-blind randomized controlled trial. *Quintessence International*, v. 45, n. 8, 2014.

VANO, M. et al. Reducing dentine hypersensitivity with nano-hydroxyapatite toothpaste: a double-blind randomized controlled trial. *Clinical oral investigations*, v. 22, n. 1, p. 313-320, 2018.

VARONI, E. M. et al. Chitosan-Based Trilayer Scaffold for Multitissue Periodontal Regeneration. *Journal of dental research*, p. 0022034517736255, 2017.

WALTER, R. et al. Effects of natural cross-linkers on the stability of dentin collagen and the inhibition of root caries in vitro. *Caries Research*, v. 42, n. 4, p. 263-268, 2008.

WANG, L. et al. Treatment of Dentin Hypersensitivity Using Nano-Hydroxyapatite Pastes: A Randomized Three-Month Clinical Trial. *Operative Dentistry*, v. 41, n. 4, p. 93-101, 2016.

WANG, X. H. et al. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, v. 24, n. 19, p. 3213-3220, 2003.

WANG, Y-L. et al. Effects of fluoride and epigallocatechin gallate on soft-drink-induced dental erosion of enamel and root dentin. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2018.

WANG, Z. et al. Effect of desensitising toothpastes on dentinal tubule occlusion: a dentine permeability measurement and SEM in vitro study. *Journal of dentistry*, v. 38, n. 5, p. 400-410, 2010.

WEST, N. X. et al. Dentin hypersensitivity: pain mechanisms and aetiology of exposed cervical dentin. *Clinical Oral Investigations*, v. 17, n. 1, p. 9-19, 2013.

WEST, N. X. et al. Prevalence of dentine hypersensitivity and study of associated factors: A European population-based cross-sectional study. *Journal of Dentistry*, v. 41, p. 841-851, 2013.

WEST, N. X.; Dentine hypersensitivity. *Monographs in Oral Science*, v. 20, p. 173-89, 2006.

XU, Z. et al. 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.

YANG, H. et al. Effects of the application sequence of calcium-containing desensitising pastes during etch-and-rinse adhesive restoration. *Journal of dentistry*, v. 42, n. 9, p. 1115-1123, 2014.

YASSEN, G. H. et al. Effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on the chemical structure of human immature radicular dentin: an in vitro study. *Journal of Endodontics*, v.39, p. 269–73, 2013.

YILMAZ, N. A.; ERTAS, E.; ORUCOĞLU, H. Evaluation of Five Different Desensitizers: A Comparative Dentin Permeability and SEM Investigation In Vitro. *The open dentistry journal*, v. 11, p. 15, 2017.

ZHONG, Y. et al. Effect of a novel bioactive glass-ceramic on dentinal tubule occlusion: an in vitro study. *Australian dental journal*, v. 60, n. 1, p. 96-103, 2015.

ZHOU, J. et al. Effects of a dicalcium and tetracalcium phosphate-based desensitizer on in vitro dentin permeability. *PloS one*, v. 11, n. 6, p. e0158400, 2016.