Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Gabriela Arantes da Conceição Sturaro

Avaliação da capacidade de limpeza e quantificação da relação amida
III/fosfato da superfície de dentina após o tratamento com quitosana/genipina

Ribeirão Preto

2017

Gabriela Arantes da Conceição Sturaro

Avaliação da capacidade de limpeza e quantificação da relação amida
III/fosfato da superfície de dentina após o tratamento com quitosana/genipina

Versão Corrigida da dissertação
apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título de Mestre
em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia
Restauradora

Orientador: Antônio Miranda da Cruz Filho

Ribeirão Preto

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central Do
Campus USP – Ribeirão Preto

Sturaro, Gabriela Arantes da Conceição

Avaliação da capacidade de limpeza e quantificação da relação amida III/fosfato da superfície de dentina após o tratamento com quitosana/genipina

115 p.; il.; 30cm

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na unidade que aloja o programa apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Odontologia Restauradora.

1. quitosana, 2. genipina, 3. EDTA, 4. camada de *smear*

Nome: Sturaro, Gabriela Arantes da Conceição

Título: Avaliação da capacidade de limpeza e quantificação da relação amida III/fosfato da superfície de dentina após o tratamento com quitosana/genipina

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia Restauradora

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa e no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dedicatória

Dedico este Trabalho

Aos meus pais, **Nilcen e Carlos** que, com muito amor, dedicaram suas vidas para minha formação tanto pessoal, profissional e acadêmica. Tudo que sou devo a vocês, muito obrigada.

Às minhas irmãs, **Carolina e Sara**. A vida não teria cor se não fossem por sua amizade, compreensão e carinho. Agradeço por cada passo que foi dado.

Ao meu marido **Rafael**. Me falta palavras para agradecer o apoio e o incentivo para passar por etapa de minha vida.

Aos meus cunhados, **Tamer e Gustavo**. São pessoas que muito admiro. Sinto o carinho que tem por mim. Muito obrigada.

Aos meus sobrinhos, **Felipe, Bianca, Arthur e Bárbara**. A inocência e a simplicidade da criança me transformaram em uma pessoa melhor. Agradeço a cada sorriso.

Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. **Antonio Miranda da Cruz Filho**, sempre com muito amor à profissão de professor me orientou e guiou ao caminho do conhecimento. Me pediu calma nos momentos de ansiedade e respondeu às minhas dúvidas com muita paciência, desde a graduação. Muito obrigada pela sua disponibilidade e por estar sempre aberto a responder minhas indagações.

Agradecimentos

À **Profª. Drª. Regina Guenka Palma-Dibb**, cujo vasto conhecimento continuamente incentivou à pesquisa todos ao seu redor. Agradeço a amizade, incentivo e troca de conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Manoel Damião de Souza Neto**, que durante as disciplinas e períodos no laboratório, nos manteve em produção, com os princípios da ciência. Nunca aprendi tanto em tão pouco tempo.

Aos demais professores do **Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Seja durante disciplinas ou durante período de clínicas contribuíram para meu crescimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Luciano Bachman**, sempre disponível a me auxiliar, abriu as portas para um conhecimento diferenciado. Obrigada pelo conhecimento e pela ajuda.

À **Profª. Drª. Débora Fernanda Costas Guedes** pelas horas de discussão sobre soluções, participação e amizade.

Aos funcionários FORP-USP, em especial **Carlos Feitosa dos Santos, Reginaldo Santana da Silva, Luiza Godol Pitol e Rosangela Angelini.**
Obrigada.

Aos amigos de pós-graduação **Paulo André Yamin, Livia Campi, Caroline Borges, Flavia Cassia Cabral Rodrigues, Fabiana Curylofo Zotti, Bruno Matos e Isadora Soares.** Obrigada pelas risadas, apoio e amizade.

Aos funcionários do **Laboratório de Microscopia Eletrônica** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Muito obrigada pela presteza e serviços.

Aos **familiares e amigos**, obrigada pelas orações e ajuda.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** da Universidade de São Paulo. Obrigada pela ajuda na formação profissional, desde a graduação.

A **Capes**, pela bolsa de estudo outorgada.

A **Deus.**

Começarei cada manhã sem medo, e buscarei os maravilhosos presentes que este dia me trará. Serei guiado por razões inteligentes, não por meras crenças, e verei sempre a verdade, ignorando aquilo que não está fundamentado em fatos. Controlarei meus pensamentos e os guiarei aos planos mais elevados, mantendo em minha mente aquelas ambições que acalento e os ideais sagrados que representam a realização para mim.

Pedro Raul Morales, O Credo da Felicidade

STURARO, G. A. C. Avaliação da capacidade de limpeza e quantificação da relação amidall/fosfato da superfície de dentina após tratamento com quitosana/genipina, 2017, 111f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O presente estudo avaliou, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), a capacidade de limpeza e as alterações da superfície dentinária após diferentes tratamentos. Foram utilizados 32 incisivos bovinos, dos quais obteve-se uma amostra de dentina do terço médio radicular de cada espécime. Inicialmente as 32 amostras foram analisadas em FT-IR após os seguintes tratamentos: dentina normal, sem tratamento (T1); NaOCl 2,5% por 5' (T2). Os espécimes foram, então, distribuídos em quatro agrupamentos conforme tratamento com soluções (n=8): T3- EDTA 15%; T4- quitosana 1% diluída em ácido acético 1% + genipina 0,06%; T5- quitosana 1% diluída em ácido acético 1% + EDTA 15% + genipina 0,06%; T6- quitosana 1% diluído em EDTA 5% + genipina 0,06%. Os dados referentes a relação amidall/fosfato de cada tratamento foi submetida ao teste ANOVA, com dados vinculados seguido do teste de Tukey ($p < 0,001$). Para a avaliação em MEV, após biomecânica de 8 raízes bovinas com limas rotatórias e NaOCl 2,5%, as mesmas foram distribuídas em 4 grupos (n=2), conforme irrigação final. As soluções utilizadas em G1, G2 G3 e G4 foram, respectivamente, as mesmas empregadas em T3, T4, T5 e T6, com volume de 1mL por 5'. Foram obtidas 6 fotomicrografias do terço médio radicular de cada espécime para análise da capacidade de limpeza e da deposição de quitosana/genipina sobre a superfície dentinária. Os resultados mostraram não haver diferença na porcentagem da razão amidall/fosfato entre T1 e T2. Houve diferença significativa entre a porcentagem da razão amidall/fosfato de T3, T4, T5 e T6 em relação à T1. A porcentagem da razão amidall/fosfato foi significativamente menor para T4 em relação a T3, T5 e T6. Todos os grupos, com exceção de G2, removeram a camada de *smear*. Observou-se deposição de quitosana/genipina sobre a dentina do G3 e G4. Dentre os tratamentos propostos, o uso de quitosana solubilizada em EDTA associada à genipina removeu a camada de *smear* sem erudir o tecido, além de evidenciar a presença de aglomerado de quitosana/genipina sobre a superfície dentinária.

Palavras-chave: Quitosana. Genipina. EDTA. Smear layer.

Abstract

STURARO, G. A. C. Evaluation of the cleaning ability and quantification of the amideIII/phosphate ratio on dentine surface after treatment with chitosan/genipine, 2017, 111 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The present study evaluated, by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) analysis, the cleaning ability and the changes of the dentin surface after different treatments. Thirty-two bovine incisors were used, from which a dentin sample was obtained from the middle third of each specimen. Initially the 32 samples were analyzed in FT-IR after the following treatments: normal dentin, without treatment (T1); NaOCl 2.5% by 5' (T2). The specimens were then distributed into four groups according to treatment with solutions (n = 8): T3- EDTA 15%; T4- chitosan 1% diluted in acetic acid 1% + genipine 0.06%; T5- chitosan 1% diluted in acetic acid 1% + EDTA 15% + genipine 0.06%; T6 chitosan 1% diluted in 5% EDTA + 0.06% genipine. The data concerning the amideIII / phosphate ratio of each treatment was submitted to the ANOVA test, with bound data followed by the Tukey test ($p < 0.001$). For evaluation in SEM, after biomechanics of 8 bovine roots with rotating files and 2.5% NaOCl, they were distributed in 4 groups (n = 2), according to final irrigation. The solutions used in G1, G2, G3 and G4 were, respectively, the same as those employed in T3, T4, T5 and T6, with a volume of 1mL per 5'. Six photomicrographs of the root mean third of each specimen were obtained for analysis of the cleaning capacity and chitosan/genipine deposition on the dentin surface. The results showed no difference in the percentage of the amide III/phosphate ratio between T1 and T2. There was a significant difference between the percentage of amide III/phosphate ratio of T3, T4, T5 and T6 in relation to T1. The percentage of the amide III/phosphate ratio was significantly lower for T4 compared to T3, T5 and T6. All groups, except for G2, removed the smear layer. Chitosan/genipine deposition was observed on G3 and G4 dentin. Among the proposed treatments, the use of chitosan solubilized in EDTA associated to genipine removed the smear layer without erode the tissue, besides evidencing the presence of agglomerate of chitosan/genipine on the dentin surface.

Key-words: Chitosan. Genipine. EDTA. Smear layer

Lista de Figuras

Figura 1. Preparo inicial dos espécimes para a análise de FT-IR-----	54
Figura 2. Finalização dos espécimes para FT-IR-----	55
Figura 3. Aparelho de FT-IR-----	57
Figura 4. Fluxograma da Metodologia da MEV-----	63
Figura 5. Gráfico representativo das bandas de dentina-----	69
Figura 6. Gráfico representativo das bandas de amida III e fosfato T3-----	70
Figura 7. Gráfico representativo das bandas de amida III e fosfato T4-----	71
Figura 8. Gráfico representativo das bandas de amida III e fosfato T5-----	72
Figura 9. Gráfico representativo das bandas de amida III e fosfatoT6-----	73
Figura 10. Gráfico com médias e desvio padrão-----	76
Figura 11. Imagem MEV G1-----	78
Figura 12. Imagem MEV G2-----	80
Figura 13. Imagem MEV G3-----	82
Figura 14. Imagem MEV G4-----	84

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados originais referentes à análise de amidaIII/fosfato-----	72
Tabela 2. Resultado da análise de variância T1, T2 e T3-----	74
Tabela 3. Resultado da análise de variância T1, T2 e T4-----	74
Tabela 4. Resultado da análise de variância T1, T2 e T5-----	74
Tabela 5. Resultado da análise de variância T1, T2 e T6-----	75
Tabela 6. Comparação entre médias com desvio padrão-----	75
Tabela 7. Porcentagem de área isenta de camada de <i>smear</i> -----	77

Sumário

INTRODUÇÃO	41
PROPOSIÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODO	51
Quantificação da porção orgânica da dentina por meio de FT-IR	53
Preparo das soluções	57
Preparo das soluções avaliadas	58
Avaliação da capacidade de limpeza e deposição de quitosana (MEV)	59
Análise estatística	64
RESULTADOS	65
Quantificação da razão amidaIII/fosfato da dentina, por meio de FT-IR	67
Avaliação MEV do aglomerado quitosana/genipina sobre a dentina	77
DISCUSSÃO	85
CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

A dentina humana é a componente estrutural mais volumosa do elemento dental e apresenta, como principal finalidade, a proteção do tecido pulpar contra estímulos externos, bem como suporte ao esmalte (Tjäderhane et al., 2012). O tecido dentinário é composto, basicamente, por 70% em peso e 45% em volume de matéria inorgânica, 18% em peso e 33% em volume de matéria orgânica e o restante, água (Lee et al., 2004; Tjäderhane et al., 2012). A porção inorgânica é constituída essencialmente de hidroxiapatita, enquanto a orgânica de fibras colágenas. Estruturalmente o colágeno é formado por dois anéis alfa I e um anel alfa II caracterizando a tripla hélice em espiral. O colágeno dentinário é na sua maioria do tipo I, embora tipos III e V também sejam encontrados. (Kinney et al., 2003).

A terapêutica endodôntica moderna preconiza o uso de instrumentos rotatórios de Ni-Ti para a excisão do tecido dentinário associada, de forma inseparável, à solução irrigadora (Alkahtani et al., 2014). Nesse sentido, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução padrão empregada, tendo em vista suas propriedades de dissolução de tecido orgânico (Del Carpio-Perochena et al., 2015), clarificação, saponificação, transformação de aminas em cloraminas, desodorização e ação antimicrobiana e neutralização de seus subprodutos (Gonçalves et al., 2016). A literatura tem relatado o uso dessa solução em concentrações que variam de 0,5% a 5,25%, no entanto, concentrações próximas a 8,5% têm sido sugerida (Cullen et al., 2015). Altas concentrações do NaOCl podem potencializar a dissolução do tecido pulpar e o efeito antimicrobiano (Cullen et al., 2015), em contrapartida, degradam a matriz de colágeno (Guida, 2006). Essa degradação acontece em duas fases, sendo a

primeira constituída da fragmentação das fibras colágenas e a segunda, hidrólise das fibras em aminoácidos (Dimitriu e Dobre, 2015).

A degradação do colágeno dentinário pode ocorrer ainda, por meio das metaloproteínases de matriz (MMPs). Essas enzimas naturais são encontradas nos diferentes tecidos do corpo humano (Almalki et al., 2016). Na dentina estão presentes de forma intrínseca e distribuídas uniformemente (Mazzoni et al., 2009) destacando-se as dos tipos MMP-1 e -8 (colagenase), -2 e -9 (gelatinase) e -3 (estromelisin). A ativação dessas MMPs depende da presença de íons zinco e cálcio (Mazzoni et al., 2015), e podem ser degradadas, em condições normais, por meio de proteinases, substâncias químicas ou baixo pH (Tjäderhane et al., 1998).

Clinicamente, a degradação do colágeno dentinário interfere negativamente na formação da camada híbrida durante a utilização de sistemas adesivos sobre a dentina (Turco et al., 2016). Além disso, o tecido dentinário constituído de fibras colágenas degeneradas, tem a sua elasticidade diminuída (Amadori et al., 2013), com consequente aumento da incidência de fraturas (Hatibović-Kofman et al., 2008).

Recentemente, a literatura tem relatado o uso de substâncias capazes de se ligarem à dentina impedindo a degradação da matriz de colágeno melhorando, significativamente, suas propriedades mecânicas (Vidal et al., 2016). Trabalhos *in vitro* mostraram que o tratamento prévio das paredes dentinárias com essas substâncias estabilizou a degradação do colágeno da dentina imersa em solução de MMPs (Walter et al., 2008; Fawzy et al., 2013). Dentre essas substâncias destaca-se a quitosana e a genipina, sendo a primeira

uma substância natural obtida a partir de exoesqueleto de crustáceos e mariscos (Ahmadi et al., 2015).

A quitosana apresenta importante papel na inibição das MMPs, atuando principalmente nos mediadores inflamatórios e promovendo a redução dos efeitos oriundos de enzimas (Oprenyeshk el al., 2015; Tormos et al., 2015). Quando aplicada em áreas de erosão do tecido dentinário, envolve o colágeno da região promovendo proteção à estrutura danificada (Sherestha et al., 2014).

Vale ressaltar que a quitosana é um agente quelante capaz de remover a camada de *smear* (Silva et al., 2011), e tem sido sugerida como possível substituta ao uso do EDTA, tendo em vista a toxicidade e efeito poluente dessa última solução (Spanó et al., 2009; Silva et al., 2011).

A genipina é um composto natural derivado da fruta jenipapo ou da flor gardênia. Tem sido utilizada na medicina tradicional oriental em função da sua ação antimicrobiana, efeito anti-inflamatório e como inibidora de edema (Nam et al., 2010). Essa substância além da comprovada ação inibitória sobre as MMPs-1 e -3 (Shindo et al., 2013), age como agente de união (*crosslink*) entre polímeros como o colágeno dentinário e a quitosana (Bedran-Russo et al., 2007). A quitosana quando associada a esse agente de união possui afinidade não-específica, tanto ao colágeno quanto à collagenase (Kishen et al., 2016).

O colágeno dentinário pode ser identificado, por meio de teste específico, ou ainda, por teste de comparação. O de comparação é considerado não-específico, visto que quantifica a porção de hidróxiapatita e proporcionalmente o de colágeno dentinário (Islam et al., 2016). Já o específico, como o Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), quantifica e qualifica a porção química

da amostra, por meio de espectrômetro de infravermelho, (Coates, 2006). Dessa forma, a quantificação da matriz colágena superficialmente à dentina, bem como da porção inorgânica pode ser identificada por meio da razão amidall/fosfato.

O uso de substâncias quelantes seguidas da solução de NaOCl para remoção da camada de *smear* (Medina et al., 2002; Selza et al., 2004; Baumgartner et al. 2007) é uma rotina na endodontia. Tal procedimento desmineraliza a porção inorgânica e expõe a matriz orgânica, com posterior degradação das fibras colágenas (Wagner et al., 2016). Assim, torna-se pertinente investigar soluções que promovam a limpeza do tecido dentinário sem, no entanto, atuar na degradação do colágeno.

O presente trabalho teve como objetivo quantificar a porção orgânica/inorgânica da dentina antes e após a utilização das seguintes soluções: EDTA 15%, quitosana 1% diluída em ácido acético 1% associada a genipina 0,06%, quitosana 1% diluída em ácido acético 1% acrescida de EDTA 15% e associadas a genipina 0,06% e, quitosana 1% diluída em EDTA 5% associada a genipina 0,06%. Nesse sentido foram considerados os seguintes aspectos:

1- Quantificação da razão amidal/fosfato da dentina radicular, por meio do teste *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR).

2- Avaliação, por meio da Microscopia eletrônica de varredura (MEV), da capacidade de limpeza e da deposição do aglomerado quitosana/genipina sobre a superfície dentinária após os tratamentos propostos.

Foram utilizados 32 incisivos centrais bovinos, os quais permaneceram armazenados em solução de timol 0,1%, em ambiente refrigerado a 12°C, até o momento do experimento. Inicialmente, procedeu-se a seleção da amostra por meio da qual os espécimes seguiram os seguintes critérios: canal único e reto, bem como ápice totalmente formado. Os dentes foram radiografados, no sentido vestibulo/palatino, para avaliar o número de canais e, por meio do exame visual, verificou-se a formação da porção apical. Aqueles que não cumpriram as características pré-estabelecidas foram substituídos.

1. Quantificação da razão amidall/fosfato da dentina, por meio de FT-IR.

Antes do início do experimento programado, os dentes foram lavados em água corrente por 24 horas para remoção do remanescente da solução de timol 0,1%. Os 32 dentes tiveram a porção coronária e terço apical da raiz removidos, por meio de máquina de corte (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). As porções proximais (mesial e distal) do remanescente radicular receberam um corte longitudinal e paralelo a face externa da raiz visando a remoção do cimento (Figura 1). O remanescente radicular foi seccionado transversalmente em três terços iguais, sendo desprezados os terços das extremidades livres, permanecendo o terço central da raiz. Esse terço central foi seccionado longitudinalmente, por meio da máquina de corte, obtendo assim, duas hemisecções. Uma hemisecção foi descartada e a outra selecionada para o teste. A face da hemisecção contendo o canal radicular foi lixada com lixa d'água de granulação 500, 2.000 e 4.000. A superfície foi desgastada até que o canal

radicular não fosse mais visualizado, tonando a superfície totalmente lisa. A face correspondente ao cimento foi lixada até a obtenção do paralelismo com a face oposta, ou seja, a que continha o canal radicular (Figura 2). A obtenção do paralelismo foi auxiliada por meio de dispositivo confeccionado especialmente para esse procedimento (Figura 2). Na sequência, apenas a face oposta ao cimento foi polida em disco de feltro associado à pasta de alumina 0,3 μ m, obtendo assim o corpo de prova.

Figura 1: preparo inicial dos espécimes: a) aspecto das raízes pré-procedimento, analisando anatomia interna e externa; b) remoção das coroas e da porção apical; c) espécime colocado na máquina de corte; d) espécime cortado com dois cortes longitudinais paralelos com a remoção do cimento.

Figura 2: Finalização do preparo dos espécimes: a) amostra do espécime cortado em *slice*; b) divisão do *slice* com auxílio de máquina de corte; c) amostra do dispositivo que confere paralelismo e polimento; d) corpo de prova encaixado no dispositivo; e) espécime com suas faces paralelas e superfície de leitura polida.

Ao final foram obtidos 32 corpos de prova, os quais foram levados para a leitura de FT-IR, por meio do aparelho Nicolet 380 (Madison, WI, USA) (Figura 3). Os espécimes foram analisados, qualitativamente, em 3 etapas, sendo a primeira destinada a avaliação do padrão do tecido dentinário, ou seja, a análise da superfície dentinária dos 32 espécimes ($n=32$), sem a ação de qualquer solução irrigadora. Esta etapa foi determinada tratamento um (T1). Na segunda, tratamento dois (T2), a análise ocorreu após a imersão do corpo de prova em solução de NaOCl 2,5% por 5 minutos. Após esse tratamento os corpos de prova foram lavados em água destilada por 15 segundos e secos em papel toalha. Na sequência os espécimes foram destinados à terceira e última etapa. Para isso,

foram distribuídos em quatro agrupamentos, de 8 espécimes cada, conforme o tratamento com as soluções irrigadoras, a seguir:

T3- EDTA 15% (pH 7,25)

T4- quitosana 1% diluída em ácido acético 1% + genipina 0,06% (pH 4,5)

T5- quitosana 1% diluída em ácido acético 1% + EDTA 15% + genipina 0,06% (pH 7,0)

T6- quitosana 1% diluído em EDTA 5% + genipina 0,06% (pH 6,0)

O corpo de prova foi imerso em 1mL da solução a ser testada por 5 minutos, sendo em seguida lavado em água destilada por 15 segundos. Vale ressaltar que o experimento foi realizado à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após a secagem em papel toalha o espécime foi posicionado no aparelho de espectroscopia de FT-IR. Este aparelho realiza o rastreamento da superfície do espécime e fornece, por meio de gráfico de absorbância e número de onda (cm^{-1}), bandas de absorção. As bandas evidenciam os três tipos de amida (I, II e III) e o fosfato da superfície da dentina, informando por meio de valor numérico a razão amidIII/fosfato . Os valores dessa razão referentes a cada grupo proposto foram armazenados em arquivos devidamente identificados.

Figura 3: Aparelho de FT-IR.

Preparo das soluções

Para o preparo das soluções a serem testadas, foram aviadas inicialmente e de forma isolada as soluções de EDTA 5%, EDTA 15%, genipina 1%, quitosana 1% diluída em ácido acético 1% e quitosana 1% diluída em EDTA 5%.

Solução de ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) 5%

Em um béquer de 20mL pesou-se 0,5g de EDTA (Merck) e adicionou-se 10mL de água deionizada. A solução foi misturada por agitação ultrassônica para completa dissolução. A solução final de aparência transparente foi armazenada em frasco âmbar de plástico com batoque e tampa e apresentou pH 4. O pH da solução foi aferido por meio de um pH-metro Analion®.

Solução de ácido Etilenodiaminotetraacético (EDTA) 15%

Em um béquer de 200mL, foram pesados 17g de EDTA (Merck) e adicionados 100mL de água deionizada. Obteve-se assim, uma solução heterogênea, a qual gotejou-se solução de hidróxido de sódio 5 mol.L⁻¹, sob constante agitação magnética, para a completa dissolução. Ao final, a solução formada mostrou-se homogênea com pH 7,25. A solução de EDTA 15% foi mantida em recipiente plástico ambar, dotado de batoque e tampa.

Solução de Genipina 1%

Para o aviamento da solução de genipina (MedChem Express, Princeton, USA), pesou-se 10mg da substância em um recipiente e acrescentou-se 1mL de ácido acético 1% para a diluição.

Solução de quitosana 1% diluída em ácido acético 1%

Em um béquer de 200mL foram pesados 0,2g de quitosana (Acros, New Jersey, USA), com grau de desacetilação próxima a 90% e peso molecular entre 10.000-300.000. Em seguida adicionou 100mL de ácido acético 1%. A mistura, inicialmente heterogênea, foi agitada por meio de agitador magnético por 2 horas, aproximadamente, quando se tornou homogênea. A solução final com pH 3,2 foi armazenada em frasco de vidro transparente.

Solução de quitosana 1% diluída em EDTA 5%

Em um béquer de 200mL foram pesados 0,2g de quitosana (Acros, New Jersey, USA) e adicionado 100mL de EDTA 5%. A dissolução da mistura ocorreu por meio de vibração ultrassônica.

Preparo das soluções avaliadas*Solução de quitosana 1% diluída em ácido acético 1% + genipina 0,06%*

Em um béquer contendo 5mL de solução de quitosana 1% diluída em ácido acético 1% foi acrescido 300µL da solução de genipina 1%. As soluções foram agitadas manualmente, por meio de espátula. Após a mistura das soluções a concentração final de genipina foi de 0,06%. A solução de quitosana + genipina 0,06% apresentou pH 3,2, sendo o mesmo neutralizado com 40µL de hidróxido de sódio 5 mol.L-1, obtendo-se ao final pH 4,5. Decorridas 36 horas do aviamento a solução adquiriu coloração azulada, fator positivo para a ligação entre genipina e quitosana.

Solução de quitosana 1% diluída em ácido acético 1% + genipina 0,06% + EDTA 15%

Em um béquer contendo 2,5mL de solução de quitosana 1% diluída em ácido acético 1% foi acrescido 2,5mL de EDTA 15%. As soluções foram agitadas e ao produto final acrescentou-se 300µL de genipina 1%, obtendo-se uma solução com pH 7,0. Após 24 horas do aviamento a solução mostrou-se azulada, indicando ligação da genipina à quitosana.

Solução de quitosana 1% diluída em EDTA 5% + genipina 0,06%

Para o preparo dessa solução foram adicionados 300µL de genipina à solução previamente aviada de quitosana 1% diluída em EDTA 5%. A solução final apresentou pH 6,0. Semelhante ao descrito com as soluções anteriores, a interação da genipina à solução de quitosana foi constatada por meio da coloração azulada da solução observada 24h após o aviamento.

2. Avaliação, por MEV, da capacidade de limpeza e deposição do aglomerado quitosana/genipina sobre a superfície dentinária,

Foram realizados ainda, dois testes complementares no sentido de verificar se as soluções testadas apresentam capacidade de remoção da camada de *smear*, e se as substâncias das soluções interagem, de alguma forma, com o colágeno dentinário.

Para esses testes foram selecionados oito incisivos centrais bovinos, os quais tiveram suas coroas removidas transversalmente, ao nível da junção esmalte cemento, e desprezadas. Realizou-se, então, o preparo cervical com brocas do tipo LA AXXESS (Sybronendo Corporation, Orange, CA), de numeração de 1 a 3, acionadas por meio de micromotor em baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto/SP, Brasil). Antes, durante e após o uso das brocas o canal foi irrigado com 1mL de NaOCl 2,5%. O comprimento de trabalho (CT) foi estipulado introduzindo-se uma lima manual K#10 (Dentsply, Maillefer, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) no interior do canal radicular até que sua ponta fosse visualizada no forame apical. A partir desse comprimento, recuou-se 1,0 mm.

Irrigou-se o canal radicular com 1mL de solução de NaOCl 2,5% e colocaram-se, sequencialmente no CT, limas manuais tipo K para determinação do diâmetro anatômico (DA). Os valores foram anotados conforme identificação da raiz correspondente. Foram selecionados dentes com DA compreendidos na faixa entre 450-500µm. Os espécimes que apresentaram diâmetros inferiores ou superiores ao intervalo padrão foram substituídos.

O preparo biomecânico foi realizado com limas rotatórias ProFile (Dentsply, Maillefer, Suíça) acionadas por meio de motor elétrico X-Smart (Dentsply Maillefer, Suíça), até o instrumento #80. A cada troca de instrumento o canal

radicular foi irrigado com 1mL de solução de NaOCl 2,5%, por meio de seringa *luer-lock* e agulha *Nav-Tip* (Ultradent Products Inc, USA). Ao término da instrumentação o canal recebeu 2mL de NaOCl seguidos de 10mL de água destilada e posterior secagem com cones de papel absorvente. Na sequência, as raízes foram distribuídas em 4 grupos (n=2), para irrigação final do canal radicular: G1- EDTA 15% (pH 7,25); G2- quitosana 1% + genipina 0,06% (pH 4,5); G3- quitosana 1% + EDTA 15% + genipina 0,06% (pH 7); G4- quitosana 1% diluída em EDTA 5% + genipina 0,06% (pH 6).

De cada solução foi utilizado volume de 1mL, a qual permaneceu no interior do canal radicular por 5 minutos à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Decorrido esse tempo realizou-se a irrigação com 3mL de água destilada. Os espécimes foram então armazenados em estufa, por 24 horas. Posteriormente, foram confeccionados sulcos longitudinais diametralmente opostos nas raízes, por meio de disco de carburundum, acoplado ao micromotor (Dabi Atlante, Ribeirão Preto/SP, Brasil). A profundidade dos sulcos foram constantemente observadas para que não houvesse exposição do canal radicular, evitando a deposição de raspas de matéria inorgânica no seu interior. Com auxílio de cureta do tipo Molt, os espécimes foram fragmentados em duas hemisecções, sendo apenas uma selecionada para o teste (Figura 4).

Inicialmente, a hemisecção passou por um processo de desidratação em uma bateria de álcool etílico ascendente (40°, 50°, 70°, 80° e 96° GL), permanecendo por 1 hora em cada concentração alcoólica e, ao final, em álcool etílico absoluto por 24 horas. Em seguida os espécimes foram colocados em um dessecador até o momento da MEV, de forma a impedir a umidificação das

amostras. No momento da análise, os espécimes receberam uma cobertura ultrafina de material eletricamente condutor (aproximadamente 30 nanômetros), por meio de um processo denominado metalização. Na sequência, foram fixados com fita adesiva condutora de corrente elétrica em suportes metálicos onde receberam uma tênue camada de ouro, por meio do aparelho Desk II Denton Vacuum (Tóquio, Japão).

Para a realização da MEV utilizou-se aparelho Jeol JSM-6610LV (Jeol, Tóquio, Japão), por meio do qual foram obtidas 6 fotomicrografias de cada espécime, com aumentos de 1.000X e 10.000X, sendo 3 fotomicrografias de cada aumento. Padronizou-se a região central do terço médio da raiz para a investigação. Assim, após a mensuração da raiz e divisão da mesma em terços, adotou-se 3 pontos distintos e aleatórios do terço médio para realizar as fotomicrografias. As imagens com aumento de 1.000X foram destinadas a avaliação qualitativa da limpeza da superfície dentinária, ou seja, presença ou não da camada de *smear*. Considerou-se ausência da camada de *smear* quando havia exposição dos túbulos dentinários em mais de 80% da imagem. A área de superfície limpa em relação à área total foi avaliada por meio do software ImageJ (1.51g, National Institute of Health - USA), com aumento dos quadrantes de 75%. As fotomicrografias com aumento de 10.000X foram destinadas a análise da deposição do aglomerado quitosana/genipina sobre a superfície da dentina.

Figura 4: Fluxograma da metodologia da MEV: a) aspecto das raízes pré-procedimento; b) espécime posicionado para remoção da coroa; c) sistema rotatório Profile e motor elétrico X-Smart; d) seringas contendo as soluções avaliadas; e) seringa de irrigação posicionada no espécime; f) preparo do sulco longitudinal na face mesial previamente realizado à clivagem; g) posicionamento da cureta de Molt; h) amostra do espécime não metalizado e metalizado; i) imagem do aparelho de microscopia.

Análise estatística

Os valores referentes a razão amidall/fosfato foram armazenados em um arquivo de dados e submetidos à análise estatística por meio do software SigmaStat 3.5 (2005). Realizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste complementar de Tukey ($\alpha=5\%$).

Os resultados referentes à quantificação da razão amidalIII/fosfato, por meio de FT-IR, bem como da avaliação da capacidade de limpeza e da deposição do aglomerado quitosana/genipina sobre a superfície dentinária, por meio da MEV, estão descritos abaixo. Para tal, este capítulo foi dividido em dois sub-itens, para melhor disposição e compreensão do assunto.

1. Quantificação da razão amidalIII/fosfato da dentina, por meio de FT-IR.

Ao final foram obtidos os dados numéricos referentes à razão amidalIII/fosfato, fornecidos pelo aparelho FT-IR, referentes aos 32 espécimes sem a ação de solução irrigadora (padrão de dentina) (T1), 32 dados referentes à razão amidalIII/fosfato após a imersão dos espécimes em solução de NaOCl 2,5% (T2), e mais 8 dados provenientes de cada um dos 4 tratamentos ($8 \times 4 = 32$) (T3, T4, T5 e T6), totalizando 96 dados numéricos correspondentes à relação da porção orgânica/inorgânica da dentina (Tabela 1).

Para efeito de ilustração, a Figura 5 mostra o gráfico, representado na ordenada pela absorbância e na abscissa pelo número de onda, da banda de absorção referente à quantificação das substâncias da dentina (água, amidas e fosfato), de um dos espécimes dos quais não receberam solução irrigadora (padrão de dentina) (T1). Os componentes da dentina de interesse no estudo foram a amida III e fosfato. Nas Figuras 6, 7, 8 e 9, os gráficos com as mesmas características descritas na Figura 5, mostram as bandas referentes à razão amidalIII/fosfato após a ação da solução de NaOCl e dos tratamentos T3, T4, T5 e T6.

Tabela 1. Dados originais referentes à razão amidalIII/fosfato de cada espécime para cada tratamento.

Trat./n	T1	T2	T3	T4	T5	T6
01	0,0104	0,0079	0,0590			
02	0,0121	0,0098	0,0705			
03	0,0138	0,0095	0,0427			
04	0,0087	0,0099	0,0375			
05	0,0129	0,0160	0,0495			
06	0,0121	0,0091	0,0574			
07	0,0108	0,0130	0,0435			
08	0,0112	0,0119	0,0525			
09	0,0010	0,0131		0,0136		
10	0,0113	0,0010		0,0159		
11	0,0090	0,0109		0,0175		
12	0,0114	0,0090		0,0177		
13	0,0127	0,0115		0,0143		
14	0,0100	0,0113		0,0157		
15	0,0121	0,0103		0,0160		
16	0,0118	0,0101		0,0160		
17	0,0128	0,0116			0,0259	
18	0,0122	0,0109			0,0777	
19	0,0136	0,0118			0,0587	
20	0,0128	0,0133			0,0401	
21	0,0150	0,0150			0,0500	
22	0,0128	0,0114			0,0541	
23	0,0139	0,0141			0,0808	
24	0,0133	0,0130			0,0798	
25	0,0123	0,0098				0,0196
26	0,0103	0,0101				0,0741
27	0,0114	0,0111				0,0407
28	0,0114	0,0113				0,0437
29	0,0100	0,0093				0,0205
30	0,0114	0,0104				0,0448
31	0,0107	0,0103				0,0321
32	0,0106	0,0103				0,0461

Figura 5. Gráfico representativo das bandas de amida (I, II e III) e fosfato, na dentina sem tratamento algum (padrão de dentina) (T1).

Figura 6. Gráfico representativos da banda (seta) de amida III (vermelho) e fosfato (azul) após o uso de NaOCl 2,5% seguido dos tratamentos com a solução de EDTA 15% (T3).

Figura 7. Gráfico representativos da banda (seta) de amida III (vermelho) e fosfato (azul) após o uso de NaOCl 2,5% seguido dos tratamentos com a solução quitosana 1% diluída em ácido acético 1% + genipina 0,06% (T4).

Figura 8. Gráfico representativos da banda (seta) de amida III (vermelho) e fosfato (azul) após o uso de NaOCl 2,5% seguido dos tratamentos com a solução de quitosana 1% diluída em ácido acético 1% + EDTA 15% + genipina 0,06% (T5).

Figura 9. Gráfico representativos da banda (seta) de amida III (vermelho) e fosfato (azul) após o uso de NaOCl 2,5% seguido dos tratamentos com a solução de quitosana 1% diluído em EDTA 5% + genipina 0,06% (T6).

Após os testes estatísticos preliminares apontarem a distribuição normal da amostra ($p=0,123$), realizou-se a análise de variância (ANOVA). Para melhor compreensão da análise estatística, vale ressaltar que nos tratamentos T3, T4 T5 e T6, foram utilizados 8 espécimes em cada um. Esses 8 corpos de provas foram originados dos 32 espécimes submetidos aos tratamentos T1 e T2, sendo assim, os dados referentes aos T3, T4, T5 e T6 são vinculados aos dos T1 e T2. Dessa forma, realizou-se a análise de variância com dados vinculados (Tabela 2) semelhante à distribuição dos dados apresentados na Tabela 1. A análise de variância comparou os dados por faixas, ou seja, os dados obtidos no T1, T2 e

T3 referentes às linhas 1 a 8 da Tabela 1. Na sequência comparou os dados obtidos no T1, T2 e T4 referentes às linhas 9 a 16 da Tabela 1. A mesma análise foi realizada para os dados das linhas 17 a 24 (T1, T2 e T5), e por último para aqueles das linhas 25 a 32 (T1, T2, T6). Os resultados da análise de variância mostraram haver diferença estatisticamente significativa entre o padrão de dentina normal (T1), entre a dentina tratada com NaOCl (T2) e os demais tratamentos (T3, T4, T5 e T6). No sentido de verificar quais dentre os tratamentos foram estatisticamente diferentes entre si, aplicou-se o teste complementar de Tukey (Tabela 6).

Tabela 2. Resultados da Análise de Variância entre T1, T2, T3

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
tratamentos	0,00871	2	0,00435	104,3	<0,001
resíduo	0,000584	14	0,000041		
Total	0,00956	23			

Tabela 3. Resultados da Análise de Variância entre T1, T2, T4

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
tratamentos	0,000132	2	0,000066	26,192	<0,001
resíduo	0,000035	14	0,0000025		
Total	0,000168	23			

Tabela 4. Resultados da Análise de Variância entre T1, T2, T5

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
tratamentos	0,0158	2	0,00789	28,625	<0,001
resíduo	0,00386	14	0,000276		
Total	0,0219	23			

Tabela 5. Resultados da Análise de Variância entre T1, T2, T6

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
tratamentos	0,00466	2	0,00233	23,289	<0,001
resíduo	0,0014	14	0,0001		
Total	0,00677	23			

Tabela 6. Comparação entre as médias com desvio padrão da razão amidall/fosfato (linhas) e porcentagem de alteração da razão amidall/fosfato (última coluna) entre os diferentes tratamentos.

	T1	T2	demaís tratamentos	% alteração
T3	0,0115 ± 0,0016 A	0,0109 ± 0,0026 A	0,0516 ± 0,0106 B	450,9 ± 91,1 b
T4	0,0110 ± 0,0013 A	0,0108 ± 0,0012 A	0,0159 ± 0,0014 B	146,2 ± 24,9 a
T5	0,0133 ± 0,0009 A	0,0127 ± 0,0015 A	0,0674 ± 0,0295 B	498,9 ± 194,5 b
T6	0,0110 ± 0,0007 A	0,0104 ± 0,0006 A	0,0403 ± 0,0173 B	368,4 ± 169,7 b

Letras MAIÚSCULAS diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos contidos nas linhas.

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos contidos na coluna.

O teste de Tukey ($p < 0,001$) mostrou, por meio das linhas (letras maiúsculas), as comparações entre os valores da razão amidall/fosfato para a dentina padrão (T1), para a dentina tratada com NaOCl 2,5% (T2), em relação a cada um dos demais tratamentos (T3, T4, T5 e T6). Os resultados mostraram, em todas as faixas de comparação, não haver diferença significativa entre o padrão de dentina (T1) em relação a dentina tratada com NaOCl 2,5% (T2). No entanto, esses tratamentos (T1 e T2) foram diferentes estatisticamente dos demais (T3, T4, T5 e T6). Com objetivo de verificar se havia diferença estatisticamente significativa, entre os tratamentos T3, T4, T5 e T6, foram estabelecidas médias da porcentagem de alteração da razão amidall/fosfato entre cada um dos referidos tratamentos (T3, T4, T5 e T6) e o padrão de dentina normal (T1). Assim, considerou-se a razão amidall/fosfato para o padrão de dentina (T1), como sendo o de 100%. As médias das porcentagens de alteração

da razão amidalIII/fosfato entre T1-T3, T1-T4, T1-T5 e T1-T6, foram apresentadas na última coluna, do teste de Tukey (Tabela 6). O teste evidenciou (letras minúsculas) existir diferença estatisticamente significativa entre T4 ($146,2 \pm 24,9$) e os demais tratamentos T3 ($450,9 \pm 91,1$), T5 ($498,9 \pm 194,5$) e T6 ($368,4 \pm 169,7$). Não houve diferença estatística entre os tratamentos T3, T5 e T6.

A Figura 10 mostra o gráfico com médias e desvio padrão referentes à porcentagem de alteração da razão amidalIII/fosfato após a ação do NaOCl 2,5% (T2) e demais tratamentos (T3, T4, T5 e T6).

Figura 10. Gráfico com médias e desvio padrão da porcentagem de alteração da razão amidalIII/fosfato, após os tratamentos T3, T4, T5 e T6.

2. Avaliação, por meio da MEV, da limpeza e análise da deposição do aglomerado quitosana/genipina sobre a dentina

A área de superfície limpa, ou seja, isenta da camada de *smear* em relação à área total analisada foi avaliada por meio do software ImageJ (1.51g, National Institute of Health - USA). Os resultados, em porcentagem, da análise qualitativa das imagens com aumentos de 1.000X estão expressos na Tabela 7. As imagens em maior aumento (10.000X) foram destinadas à análise da deposição de quitosana/genipina sobre a superfície de dentina.

Tabela 7. Porcentagem de área isenta de camada de *smear* para cada grupo.

Grupos	Área livre da camada de <i>smear</i> (%)
G1	99,93%
G2	6%
G3	99,32%
G4	97,64%

Nos espécimes tratados com EDTA 15% (G1) pôde-se observar os canalículos dentinários em toda área da fotomicrografia, sem evidências da camada de *smear* (Figura 11a). Em relação a deposição de quitosana/genipina sobre a dentina, observou-se em grande parte da imagem (10.000X), porção inorgânica da dentina e, em menor proporção, fibras colágenas em pequenas áreas do espaço intertubular. As fibras colágenas foram identificadas como sendo as linhas mais tênues e esbranquiçadas na superfície da dentina e na embocadura dos túbulos dentinários (Figura 11b).

Figura 11: Imagens da MEV dos espécimes do G1. a) nota-se a presença de canalículos dentinários abertos e ausência da camada de *smear*. b) as setas indicam fibras colágenas expostas ao longo da superfície da dentina e em maior concentração ao redor dos canalículos dentinários.

As imagens do grupo no qual utilizou-se quitosana 1% + genipina 0,06% (G2) mostram a camada de *smear* recobrindo grande parte da superfície dentinária. Pouquíssimos canalículos puderam ser visualizados nesse grupo, impossibilitando a análise da deposição do aglomerado quitosana/genipina sobre a superfície do tecido dentinário (Figura 12).

Figura 12: Imagens da MEV dos espécimes do G2. a) nota-se a camada de *smear* recobrindo a maioria da superfície dentinária e pouquíssimos canalículos visíveis. b) detalhe da camada de *smear* sobre a dentina (10.000X).

Nos espécimes irrigados com quitosana 1% + EDTA 15% + genipina 0,06% (G3) a camada de *smear* foi totalmente removida deixando amostra os canalículos dentinários. Pelas imagens, pode-se perceber, nítida erosão do tecido dentinário. Em maior aumento (10.000X), a imagem sugere presença do aglomerado quitosana/genipina depositado em várias regiões da superfície dentinária (Figura 13).

Figura 13. Imagens da MEV dos espécimes do G3. a) dentina erudida e isenta da camada de *smear* com exposição dos canalículos dentinários. b) as setas mostram possíveis aglomerados quitosana/genipina depositados sobre a dentina.

No G4, cujos espécimes foram tratados com quitosana 1% diluída em EDTA 5% com genipina 0,06% pôde-se observar por toda imagem (1.000X) os canalículos dentinários abertos e nenhuma evidencia da camada de *smear*. A imagem (Figura 14b) sugere densa e volumosa camada do aglomerado quitosana/genipina depositada sobre a superfície do tecido dentinário.

Figura 14: Imagens da MEV dos espécimes do G4. a) dentina totalmente isenta da camada de *smear* com canalículos nitidamente visíveis (1.000X). b) possível camada densa do aglomerado quitosana/genipina recobrindo o tecido dentinário (10.000X).

No presente estudo foram utilizadas duas metodologias distintas destinadas à quantificação e análise da porção orgânica/inorgânica da dentina, bem como, à avaliação da limpeza do canal radicular após aplicação de diferentes soluções químicas. O primeiro método, análise *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR), foi empregado para quantificar a amidall e fosfato presentes na amostra de dentina antes e após a aplicação das soluções. Este método é bastante utilizado na identificação e quantificação de substâncias que integram estruturas do tecido orgânico e inorgânico dentinário (Liu et al., 2016). O aumento da razão amidall/fosfato é proveniente de uma maior ação da solução quelante sobre a estrutura inorgânica e, menor ou nenhuma sobre a porção orgânica. A presença de amidall na dentina representa integridade da cadeia de tripla hélice, e conseqüentemente, presença de fibrilas colágenas íntegras (Tonhi et al., 2002; Persadmehr et al., 2014; Liu et al., 2016; Kishen et al., 2016). Já a diminuição da razão amidall/fosfato sugere desnaturação da porção orgânica e menor efeito da solução sobre o tecido inorgânico. O segundo método, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), serviu para avaliação da capacidade de limpeza da superfície dentinária, bem como, para verificar a possível deposição do aglomerado quitosana/genipina sobre a dentina. A utilização da MEV para verificar a capacidade de limpeza da dentina radicular já esta consagrada pela literatura (Giudice et al., 2016; Scelza et al., 2016). A mesma metodologia tem sido utilizada em estudos recentes para investigar as alterações morfológicas do colágeno após o tratamento da dentina por diferentes substâncias (Fawzy et al., 2012 ;Kong et al., 2016). A qualidade das imagens apresentadas nos artigos endossa a utilização do método.

Para ambas as análises utilizaram-se corpos-de-prova provenientes de dentes bovinos. A similaridade entre a composição química da dentina humana e da bovina permitiu a realização do presente experimento sem, contudo, apresentar alterações significantes entre os tecidos (Teruel et al. 2015). Uma revisão sistemática da literatura abrangendo dados de 1953 a 2010 corroboram a afirmação anterior e, ressaltam que a semelhança entre os dois tecidos dentinários, além da composição química inclui ainda, a estrutura morfológica (Yassen et al., 2010).

Os resultados do presente experimento mostraram que a porcentagem de alteração da razão amidall/fosfato da dentina imersa, por 5 minutos, em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (T2) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada à da dentina sem tratamento algum (T1). A semelhança da razão amidall/fosfato entre os dois tratamentos indica que a solução de NaOCl 2,5% não promoveu alterações significantes sobre as estruturas orgânicas e inorgânicas da dentina. A solução de NaOCl não apresenta efeito solvente sobre tecido inorgânico (Thanatvarakorn et al., 2014). No entanto, a ação solvente dessa solução sobre o tecido pulpar é bastante conhecida (Cullen et al., 2015; Niewierowski et al., 2015), bem como, sua capacidade de promover a desnaturação de fibrilas colágenas (Varela et al., 2003; Santos et al., 2006; Thanatvarakorn et al., 2014; Tartari, et al., 2016). A propriedade de solvência do NaOCl sobre estruturas orgânicas depende do tempo de contato, concentração e temperatura da solução (Dimitriu e Dobre, 2015; Tartari et al., 2016). Trabalho anterior mostrou que o NaOCl 2,5% à 25°C degradou fibrilas colágenas após 10 minutos de contato com a dentina radicular.

O uso de NaOCl 5%, na mesma temperatura, precisou de apenas 3 minutos para promover a desnaturação (Tartari et al., 2016). No presente estudo, utilizou-se solução de NaOCl 2,5% com tempo de aplicação de 5 minutos a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. O tempo de aplicação adotado provavelmente não foi o suficiente para degradar de forma significativa as fibrilas colágenas quando comparado ao padrão de dentina normal (T1). A degradação da porção orgânica dentinária repercute, dentre outras consequência, na diminuição da resistência de união de materiais restauradores resinosos e de cimentos endodônticos (Santos et al. 2006; Neelakantan et al. 2015; Tartari et al., 2016).

Durante a biomecânica do canal radicular, há formação e deposição da camada de *smear* sobre as paredes dentinárias. A literatura tem apontado que a remoção dessa camada aumenta a chance de sucesso da terapêutica endodôntica. A ausência da camada de *smear* viabiliza a penetração de cimento através dos túbulos dentinários (Moon et al., 2010), favorecendo a resistência mecânica da massa obturadora (Rached-Junior et al., 2009), além de dificultar a repopulação e/ou inativar microorganismos do interior dos canalículos (Amoroso-Silva et al., 2014). Para a remoção dos componentes orgânicos e inorgânicos da camada de *smear* recomenda-se o uso de solução quelante associada à solução de NaOCl (Baumgartner et al., 2007). No entanto, essa associação potencializa a erosão do tecido dentinário (Niu et al., 2002). A solução quelante além de promover a erosão da dentina peritubular, acaba, por consequência, expondo a matriz orgânica de colágeno. O uso sequencial da solução de NaOCl atua diretamente sobre a estrutura orgânica, favorecendo sua degradação (Wagner et al., 2016).

A proposta para utilização da solução de quitosana 0,2% destinada à limpeza da superfície dentinária esta baseada na sua capacidade de remover a camada de *smear* com menor efeito erosivo à dentina (Silva et al., 2012). Em somatória, a quitosana tem a capacidade de envolver e proteger a fibra colágena (Shrestha et al., 2014), estabilizando sua degradação (Walter et al., 2008; Fawzy et al., 2013).

Diferentes formulações associando a quitosana 1%, EDTA a 5 e 15% e genipina 0,06% foram avaliadas e avaliadas no presente experimento. Os resultados mostraram que a porcentagem da razão amidall/fosfato encontrada nos tratamentos propostos (T3, T4, T5 e T6) foi significativamente diferente ao da dentina normal (T1). Os tratamentos que apresentaram as maiores porcentagens de alteração da razão amidall/fosfato em relação a dentina normal foram o T5 (498,9), T3 (450,9) e T6 (368,4), sem no entanto, apresentarem diferenças significantes entre eles. A maior quantidade de amidall em relação ao fosfato sugere descalcificação da porção inorgânica da dentina e exposição de fibrilas colágenas. Os valores fornecidos por meio do teste FT-IR associados às imagens da MEV referentes a cada tratamento ajudam no raciocínio e entendimento dos resultados, bem como nas possíveis consequências clínicas. As fotomicrografias referentes ao T3, EDTA 15% (pH 7,25), revelam ausência da camada de *smear* (1.000X), com exposição de colágeno ao longo da superfície dentinária (10.000X). O efeito quelante do EDTA promoveu a limpeza das paredes dentinárias. No entanto, as fibras colágenas permaneceram expostas e vulneráveis ao efeito das MMPs (metaloproteinases de matriz), bem como, passíveis de serem degradadas pelo NaOCl quando utilizado para irrigação final

do canal radicular (Sherestha et al., 2016). Já no tratamento com quitosana 1% diluída em ácido acético 1% associado à genipina 0,06% (pH 4,5) (T4) a porcentagem de alteração da razão amidall/fosfato apesar de diferente da dentina normal, foi significativamente menor em relação aos demais grupos. A diminuição da razão amidall/fosfato deve-se à presença da camada de *smear* sobre a superfície dentinária, na qual a quantidade de fosfato predomina sobre a de amidall. As fotomicrografias mostraram grande parte da superfície dentinária recoberta pela camada de *smear*, o que impossibilitou a análise da porção de colágeno em maior aumento (10.000X). Trabalho anterior relatou que a solução de quitosana 0,2% (pH 3,2) diluída em ácido acético 1% apresenta capacidade de remoção da camada de *smear*, de forma semelhante ao EDTA 15% (Silva et al., 2011). No presente estudo, a concentração da solução de quitosana 1% (pH 4,5) foi maior que a do trabalho anterior (0,2%), o que deveria proporcionar capacidade de limpeza, no mínimo, semelhante ao G1 (EDTA 15%). A quitosana é um ótimo adsorvente de metais (Varma et al., 2004), possui capacidade para formar complexos com íons metálicos devido à presença de amino-grupos presentes em sua estrutura (Kurita, 2006). No entanto, no presente estudo, a quitosana foi associada à genipina 0,06%. A união entre as substâncias ocorre por meio da reação de polimerização na qual o grupamento amino da quitosana liga-se ao grupamento éster da genipina (Gonsalves et al., 2011). O composto formado, provavelmente, apresenta menor disponibilidade de grupamento amina livre para adsorver íons metálicos, diminuindo o efeito quelante sobre a camada de *smear*, o que pode justificar a presença desta camada após o tratamento T4. Outro fator a ser considerado é o pH das

soluções. No primeiro trabalho a quitosana apresentava pH 3,2 e, no presente estudo, pH 4,5. O pH mais ácido favorece a desmineralização da porção inorgânica da camada de *smear* (Kurita, 2006). Diante da propriedade quelante ineficiente do composto formado entre quitosana 1% diluída em ácido acético 1% e genipina 0,06%, pensou-se em acrescentar a este tratamento (T4) uma solução que promovesse a remoção da camada de *smear*, o EDTA 15%. Essa proposta baseou-se em trabalho anterior, no qual utilizaram para a limpeza da dentina, nanopartículas de quitosana associada ao EDTA 17%, na proporção 1:1 (Del Carpio-Perochena et al., 2015). O resultado final da combinação de quitosana associada à genipina e ao EDTA originou o T5. Os resultados com esse tratamento evidenciaram, por meio da MEV, dentina sem camada de *smear* e bastante erodida. Sobre a superfície dentinária observou-se aglomerado de quitosana/genipina sugerindo união desse composto às fibras colágenas. A união entre colágeno e quitosana ocorre por meio de complexo clássico de poliânion-polication resultando em um complexo insolúvel (Kishen et al., 2016). O efeito quelante acentuado ocorreu, provavelmente, devido a potencialização da desmineralização do tecido dentinário promovida pela quitosana e EDTA. O efeito erosivo da dentina pelo uso de EDTA com tempo superior a 1 minuto já foi relatado pela literatura (Calt e Serper, 2002; Moreira et al., 2009). Particularmente no presente estudo, provavelmente, ao adicionar EDTA 15% à associação de quitosana 1% e genipina 0,06% houve interação de parte da genipina com a quitosana e parte com o EDTA, visto que esse quelante também apresenta grupamento amino (Nghah e Mayanar, 2002). A reação de polimerização entre quitosana e genipina, observada neste estudo durante o

aviamiento do composto, ocorreu de forma progressiva sugerindo a conclusão da polimerização após 24 horas, aproximadamente. A constatação da reação de polimerização entre a solução de quitosana, de coloração leitosa, e a genipina de cor branca, foi evidenciada por meio da coloração azulada do composto, característica comum desse tipo de reação. A não polimerização total entre a quitosana e genipina no início da associação, provavelmente, permitiu que parte da genipina interagisse também com o EDTA. Estudo prévio mostrou que após a consumação da reação de *cross-link* da quitosana solubilizada em ácido acético, com outra substância, a adição posterior de EDTA não interfere no composto. Porém, até a reação se processar, se houver a adição de EDTA à mistura, o mesmo interage com a quitosana (Nghah e Mayanar, 2002). Não fica claro, neste estudo, se a interação consiste numa solubilização da quitosana no EDTA ou se ocorre outro tipo de reação. Dessa forma, bem provavelmente, parte da quitosana que interagiu com o EDTA potencializou o efeito quelante com remoção da camada de *smear* e erosão do tecido dentinário. A parte da solução de quitosana que formou o *cross-link* com a genipina depositou-se sobre a superfície dentinária conforme observado pelas fotomicrografias (10.000X). O produto final entre EDTA e genipina, provavelmente, não apresentou efeito algum. Clinicamente, o efeito desse tratamento sobre o tecido dentinário não repercute em benefícios claros. Apesar da proteção das fibrilas colágenas pelo aglomerado de quitosana/genipina, as consequências do efeito da erosão no tecido dentinário ainda não estão esclarecidas (Wagner et al., 2016; Wang et al., 2016).

A quitosana diluída em EDTA 5% ainda não havia sido reportada pela literatura. Sabe-se que a quitosana é insolúvel em meio aquoso, porém solúvel em vários ácidos orgânicos com pH abaixo de 6,0 (Gonsalves et al., 2011; Thevarajah et al., 2016). O EDTA 15% é encontrado no comércio com pH próximo a 7,0, enquanto o EDTA 5% em torno de 3,6-4,0. Dessa forma, optou-se pela diluição da quitosana em EDTA com uma concentração menor que a convencional, porém com pH ácido.

O pH final da solução de quitosana é um fator importante e deve ser considerado. Em pH entre 3,5-5 a quitosana apresenta maior disponibilidade de seus radicais amino, favorecendo a ligação com substâncias chamadas agente de união (*cross-link*), como a genipina (Rázga et al. 2016). O agente de união viabiliza a união entre quitosana e fibrilas colágenas, melhorando as características mecânicas e físicas da dentina (Bedran-Russo et al., 2007; Al-Ammar et al., 2009; Hiraishi et al., 2013).

O tratamento do tecido dentinário com quitosana 1% solubilizada em EDTA 5% associada à genipina 0,06% (pH 6,0) (T6) apresentou resultados bem interessantes. As imagens por meio da MEV evidenciaram superfície dentinária isenta da camada de *smear*, com canalículos abertos e visíveis, sem aparentemente, promover a erosão da dentina. Em maior aumento, observou-se densa camada de quitosana/genipina sobre a superfície dentinária.

A genipina quando associada ao colágeno protege as fibrilas contra enzimas bacterianas, especificamente a collagenase, responsável pela degradação do tecido orgânico (Nagaoka et al., 2014). As fibrilas colágenas quando íntegras mostram-se uniformemente espalhadas pela dentina e sem

interrupções (Kishen et al., 2016), e são essenciais para a adesão de cimentos endodônticos (Neelakantan et al. 2015).

A literatura sugere que o efeito *cross-link* da quitosana previne a desnaturação da rede de colágeno mesmo após o condicionamento ácido da dentina, favorecendo maior imbricação do material restaurador resinoso (Daood et al., 2013). Trabalhos anteriores mostraram, ainda, que a solução de quitosana aumenta a resistência mecânica da dentina (Sherestha et al. 2011), além da substância ser dotada de propriedade antimicrobiana (Kishen et al., 2008; Persadmehr et al., 2014; Del Carpio-Perochena et al., 2015).

A somatória de efeitos positivos da quitosana sugere que essa substância associada à genipina é uma opção bastante interessante na manutenção da integridade das fibrilas colágenas dentinárias. O protocolo de irrigação destinado à limpeza do canal radicular que preconiza o uso alternado do EDTA com NaOCl, repercute em prejuízos à matriz orgânica. Quando o NaOCl é utilizado antes do agente quelante, a hidroxiapatita promove a proteção das fibrilas colágenas. Quando após o uso do EDTA, o colágeno exposto sofre ação direta do NaOCl, favorecendo a erosão (Wang et al., 2016) e diminuindo a resistência mecânica da dentina (Wagner et al., 2016).

A MEV e o teste de FT-IR utilizados no presente estudo permitiram a visualização das alterações e análise superficial da dentina, somente a poucos microns de profundidade do tecido dentinário (Yassen et al., 2015). Assim, diante das limitações do presente estudo, análises das estruturas mais profundas da dentina, bem como, testes de resistência mecânica com materiais restauradores e obturadores devem ser realizados.

Conclusão

De acordo com a metodologia utilizada e os resultados obtidos, pode-se concluir:

- 1- Todos os tratamentos propostos, com exceção do uso de NaOCl, promoveram alteração da razão amidal/fosfato.
- 2- As soluções avaliadas promoveram a remoção da camada de *smear*, com exceção do uso de NaOCl e de quitosana 1% solubilizada em ácido acético + genipina.
- 3- Após o uso de quitosana observou-se possível deposição do aglomerado quitosana/genipina sobre a superfície dentinária somente nos tratamentos T5 e T6.

Referências Bibliográfica

AHMADI, F.; OVEISI, Z.; SAMANI, S. M.; AMOOZGAR, Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. **Res Pharm Sci**. v. 10, n. 1, p. 1-16, 2015.

AL-AMMAR, A.; DRUMMOND, J. L.; BEDRAN-RUSSO, A. K. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. v. 91, n. 1, p. 419-24, 2009.

ALKAHTANI A.; ALKAHTANY S. M.; ANIL S. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of varying concentrations of sodium hypochlorite on human mesenchymal stem cells. **J Contemp Dent Pract**. v. 15, n. 4, p. 473-81, 2014.

ALMALKI S. G.; AGRAWAL D. K. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. **Stem Cell Res Ther**. v. 7, n. 1, p. 129, 2016.

AMADORI, S.; BONETTI, E.; CAMPARI, E. G.; CAPPELLONI, I.; MONTANARI, R. Anelastic phenomena associated to water loss and collagen degradation in human dentin. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. v. 33, n. 3, p. 1455-9, 2013.

AMOROSO-SILVA, P. A.; GUIMARÃES, B. M.; MARCIANO, M. A.; DUARTE, M. A.; CAVENAGO, B. C.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; ALMEIDA, M. M.; MORAES, I. G. Microscopic analysis of the quality of obturation and physical properties of MTA Filapex. **Micros. Res Tech**. v. 77, n.12, p. 1031-6, 2014.

BAUMGARTNER, J. C.; JOHAL, S.; MARSHALL, G. Comparison of the antimicrobial efficacy of 1,3% NaOCl/BioPure MTDA to 5,25% NaOCl/15% EDTA for root canal irrigation. **J of Endod**, v. 33, n.1, p. 48-51, 2007

BEDRAN-RUSSO, A. K.; PEREIRA, P. N.; DUARTE, W. R.; DRUMMOND, J. L.; YAMAUCHI, M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. v. 80, n. 1, p. 268-72, 2007

CALT, S.; SERPER, A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. **J Endod.** n. 28, n. 1, p. 17-9, 2002.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. **Encyclopedia of Anal Chem.** 2006

CULLEN, J. K.; WEALLEANS, J. A.; KIRKPATRICK, T. C.; YACCINO, J. M. The effect of 8.25% sodium hypochlorite on dental pulp dissolution and dentin flexural strength and modulus. **J Endod.** v. 41, n. 6, p. 920-4, 2015

DAOOD, U.; IQBAL, K.; NITISUSANTA, L. I.; FAWZY, A. S.; Effect of chitosan/riboflavin modification os resin/dentin interface: spectroscopi and microscopic investigations. **J Bio Mat Res.** v. 101A, n. 7, p. 1846-66, 2013.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A.; BRAMANTE, C. M.; DUARTE, M. A.; DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; KISHEN, A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. **Restor Dent Endod.** v. 40, n. 3, p. 195-201, 2015.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A.; KISHEN, A.; SHRESTHA, A.; BRAMANTE, C. M. Antibacterial Properties Associated with Chitosan Nanoparticle Treatment on Root Dentin and 2 Types of Endodontic Sealers. **J Endod.** v. 41, n. 8, p. 1353-8, 2015.

DIMITRIU, D.; DOBRE, T. Effects of temperature and hypochlorite concentration on the rate of collagen dissolution. **J Endod.** v. 41, n. 6, p. 903-6, 2015.

FAWZY, A. S.; NITISUSANTA, L. I.; IQBAL, K.; DAOOD, U.; BENG, L. T.; NEO, J. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. **J Mech Behav Biomed Mater.** v. 17, p. 278-89, 2013.

GIUDICE, G. L.; LIZIO, A.; GIUDICE, R. L.; CENTOFANTI, A.; RIZZO, G.; RUNCI, M.; ALBRANDI, A.; CICCÌÙ, M. The effect of different cleaning protocols on post space: a SEM study. **Int J Dent. In press.** 2016

GONÇALVES, L. S.; RODRIGUES, R. C.; ANDRADE JUNIOR, C. V.; SOARES, R. G.; VETTORE, M. V. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine as irrigant solutions for root canal disinfection: a systematic review of clinical trials. **J Endod**, v. 42, n. 4, p. 527-32, 2016

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART M. O. F.; ABREU F. C. DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA A RETICULAÇÃO DE QUITOSANA. **Quim Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GUIDA, A. Mechanism of action of sodium hypochlorite and its effects on dentin. **Minerva Stomatol.** v. 55, n. 9, p. 471-82, 2006.

HATIBOVIĆ-KOFMAN, S.; RAIMUNDO, L.; ZHENG, L.; CHONG, L.; FRIEDMAN, M.; ANDREASEN, J. O. Fracture resistance and histological findings of immature teeth treated with mineral trioxide aggregate. **Dent Traumatol.** v. 24, n. 3, p. 272-6, 2008.

HIRAISHI, N.; SONO, R.; SOFIQUL, I.; YIU, C.; NAKAMURA, H.; OTSUKI, M.; TAKATSUKA, T.; TAGAMI, J. In vitro evaluation of plant-derived agents to preserve dentin collagen. **Dent Mater.** v. 29, n. 10, p. 1048-54, 2013.

ISLAM, M.S.; KHUNKAR, S.J.; NAKASHIMA, S.; SADR, A.; NIKAIDO, T.; TAGAMI, J. Comparative study of demineralized collagen degradation determined by Hydroxyproline assay and Microscopic depth measurement. **J Dent. In press**, 2016.

KINNEY, J. H.; HABELITZ, S.; MARSHALL, S. J.; MARSHALL, G. W. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. **J Dent Res.** v. 82, n. 12, p. 957-61, 2003.

KISHEN, A.; SHI, Z.; SHRESTHA, A.; NEOH, KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. **J Endod**. v. 34, n. 12, p. 1515-20, 2008.

KISHEN, A.; SHRESTHA, S.; SHRESTHA, A.; CHENG, C.; GOH C. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. **Dent Mater**. v. 32, n. 8, p. 968-77, 2016.

KONG, K.; HIRAISHI, N.; NASSAR, M.; OTSUKI, M.; YIU, C. K. Y.; TAGAMI, J. Effect of phytic acid etchant on resin-dentin bonding: monomer penetration and stability of dentin collagen. **J Prost Res**. *In press*. 2016

KURITA K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Mar Biotechnol**. v. 8, n. 3, p. 203-26, 2006.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Mar Biotechnol**. v. 8, n. 3, p. 203-26, 2006.

LIU, X.; DAN, N.; DAN, W.; GONG, J. Feasibility study of the natural derived chitosan dialdehyde for chemical modification of collagen. **Int J Bio Macro**. v. 82, p. 989-97, 2016

MAZZONI A, PASHLEY DH, TAY FR, GOBBI P, ORSINI G, RUGGERI A JR, CARRILHO M, TJÄDERHANE L, DI LENARDA R, BRESCHI L. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. **J Biomed Mater Res A**. v. 88, n. 3, p. 697-703, 2009.

MAZZONI, A.; TJÄDERHANE, L.; CHECCHI, V.; DI LENARDA, R.; SALO, T.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; BRESCHI, L. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. **J Dent Res**. v. 94, n. 2, p. 241-51, 2015.

MEDINA V. O. III; SHINKAI K.; SHIRONO M.; TANAKA N.; KATOH Y. Histopathologic study on pulp response to single-bottle and self-etching adhesive systems. **Oper Dent.** v. 27, n. 4, p. 330-42, 2002.

MOON, Y. M.; SHON, W. J.; BAEK, S. H.; BAE, K. S.; KUM, K. Y.; LEE, W. Effect of final irrigation regimen on sealer penetration in curved root canals. **J Endo.** v. 36, n. 4, p. 732-6, 2010

MOREIRA, D. M.; ALMEIDA, J. F.; FERRAZ, C. C.; GOMES, B. P.; LINE, S. R.; ZAIA, A. A. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. **J Endod.** v. 35, n. 7, p. 1023-7, 2009.

NAGAOKA, H.; NAGAOKA. H.; WALTER, R.; BOUSHELL, L. W.; MIGUEZ, P. A.; BURTON, A.; RITTER. A. V.; YAMAUCHI, M. Characterization of genipin-modified dentin collagen. **Biomed Res Int.** 2014.

NAM, K. N.; CHOI, Y. S.; JUNG, H. J.; PARK, G. H.; PARK, J. M.; MOON, S. K.; CHO, K.H.; KANG C.; KANG I.; OH M.S.; LEE E. H. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells. **Int Immunopharmacol.** v. 10, n. 4, p. 493-9, 2010.

NEELAKANTAN, P.; SHARMA, S.; SHEMESH, H.; WESSELINK, P. R. Influence of Irrigation Sequence on the Adhesion of Root Canal Sealers to Dentin: A Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Push-out Bond Strength Analysis. **J Endod.** v. 41, n. 7, p. 1108-11, 2015.

NGAH, W. S. W.; MAYANAR, C. S. E. R. Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. **Reac and Funct Pol.** v. 50, n. 2, p. 181-90, 2002.

NIIEWIEROWSKI, R. S.; SCALZILLI, L. R.; MORGENTAL, R. D.; FIGUEIREDO, J. A. P.; VIER-PELISSER, F. V.; BORBA, M. G.; GHISI, A. C. Bovine pulp tissue

dissolution ability of irrigants associated or not to ultrasonic agitation. **Bras Dent J.** v. 26, n. 5, p. 537-40, 2015.

NIU W.; YOSHIOKA T.; KOBAYASHI C.; SUDA H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. **Int Endod J.** v. 35, n. 11, p. 934-9, 2002.

OPRENYESZK, F.; SANCHEZ, C.; DUBUC, J. E.; MAQUET, V.; HENRIST, C.; COMPERE, P.; HENROTIN, Y. Chitosan enriched three-dimensional matrix reduces inflammatory and catabolic mediators production by human chondrocytes. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. 128362, 2015.

PERSADMEHR, A.; TORNECK, C. D.; CVITKOVITCH, D. G.; PINTO, V.; TALIOR, I.; KAZEMBE, M.; SHRESTHA, S.; MCCULLOCH, C. A.; KISHEN, A. Bioactive chitosan nanoparticles and photodynamic therapy inhibit collagen degradation in vitro. **J Endod.** v. 40, n. 5, p. 703-9, 2014.

RACHED-JUNIOR, F. J.; SOUZA-GABRIEL, A. E.; ALFREDO, E.; MIRANDA, C. E.; SILVA-SOUZA, Y. T.; SOUZA-NETO, M. D. Bond strength of Epiphany sealer prepared with resinous solvent. **J Endod.** v. 35, n. 2, p.251-5, 2009.

RÁZGA, F.; VNUKOVÁ, D.; NÉMETHOVÁ, V.; MAZANCOVÁ, P.; LACÍK, I. Preparation of chitosan-TPP sub-micron particles: Critical evaluation and derived recommendations. **Carbohydr Polym.** v. 20, n. 151, p. 488-99, 2016.

SANTOS J. N.; CARRILHO M. R.; DE GOES M. F.; ZAIA A. A.; GOMES B. P.; SOUZA-FILHO F. J.; FERRAZ C. C. Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. **J Endod.** v. 32, n. 11, p. 1088-90, 2006.

SCELZA, M. Z.; NORONHA, F.; SILVA, L. E.; MAURICIO, M.; GALLITO, M. A.; SCELZA, P. Effect of citric acid and ethylenediaminetetraacetic acid on the

surface morphology of Young and old root dentin. **Iran Endod J.** v. 11, n. 3, p. 188-191, 2016.

SHERESTHA, S.; TORNECK, C. D.; KISHEN, A. Dentin conditioning with bioactive molecule releasing nanoparticle system enhances adherence, viability, and differentiation os steam cells from apical papilla. **J Endod.** v. 42, n. 5, p. 717-23, 2016.

SHINDO, S.; HOSOKAWA, Y.; HOSOKAWA, I.; OZAKI, K.; MATSUO, T. Genipin inhibits MMP-1 and MMP-3 release from TNF- α -stimulated human periodontal ligament cells. **Biochimie.** v. 107, p. 391-5, 2014.

SHRESTHA, A.; FRIEDMAN, S.; KISHEN, A. Photodynamically crosslinked and chitosan-incorporated dentin collagen. **J Dent Res.** v. 90, n. 11, p. 1346-51, 2011.

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

SILVA, P. V.; GUEDES, D. F.; PÉCORA, J. D.; DA CRUZ-FILHO, A. M. Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. **Braz Dent J.** v. 23, n. 4, p. 357-61, 2011.

SPANÓ, J. C.; SILVA, R. G.; GUEDES, D. F.; SOUSA-NETO, M. D.; ESTRELA, C.; PÉCORA, J. D. Atomic absorption spectrometry and scanning electron microscopy evaluation of concentration of calcium ions and smear layer removal with root canal chelators. **J Endod.** v. 35, n. 5, p. 727-30, 2009.

TARTARI, T.; BACHMANN, L.; MALIZA, A. G. A.; ANDRADE, F. B.; DUARTE, M. A. H.; BRAMANTE, C. M. **J Appl Oral Sci.** v. 24, n. 3, p. 291-8, 2016.

TERUEL J. D. E. D.; ALCOLEA, A.; HERNÁNDEZ, A.; RUIZ, A. J. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. **Arch Oral Biol.** v. 60, n. 5, p. 768-75, 2015.

THANATVARAKORN, O.; NAKAJIMA, M.; PRASANSUTTIPORN, T.; ICHINOSE, S.; FOXTON, R. M.; TAGAMI, J. Effect of smear layer deproteinizing on resin-dentine interface with self-etch adhesive. **J Dent.** v. 42, n. 3, p. 298-304, 2014.

THEVARAJAH, J. J.; VAN LEEUWEN, M. P.; COTTET, H.; CASTIGNOLLES P.; GABORIEAU M. Determination of the distributions of degrees of acetylation of chitosan. **Int J Biol Macromol**, v. 95, p. 40-8.

TJÄDERHANE, L.; CARRILHO, M. R.; BRESCHI, L.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Dentin Basic Structure and Composition – a overview; **Endo Topic**, v. 20, p. 3-29. 2012

TONHI E.; PLEPIS, A. M. G. Preparation and characterization of collagen-chitosan blends. **Quim Nova.** v. 25, n. 6, p. 82-9, 2002.

TORMOS, C. J.; ABRAHAM, C.; MADIHALLY, S. V. Improving the stability of chitosan-gelatin-based hydrogels for cell delivery using transglutaminase and controlled release of doxycycline. **Drug Deliv Transl Res**, v. 5, n. 6, p. 575-84, 2015.

TURCO, G.; FRASSETTO, A.; FONTANIVE, L.; MAZZONI, A.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; BRESCHI, L. Occlusal loading and cross-linking effects on dentin collagen degradation in physiological conditions. **Dent Mater.** v. 32, n. 2, p. 192-9, 2016.

VARMA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydr Polym.** v. 55, p. 77-93, 2004.

VIDAL, C. M.; ZHU, W.; MANOHAR S.; AYDIN B.; KEIDERLING T. A.; MESSERSMITH P. B.; BEDRAN-RUSSO A. K. Collagen-collagen interactions mediated by plant-derived proanthocyanidins: A spectroscopic and atomic force microscopy study. **Acta Biomater.** v. 41, p. 110-8, 2016.

WAGNER, M. H.; ROSA. R. A.; FIGUEIREDO, J. A. P.; DUARTE, M. A. H.; PEREIRA, J. R.; SÓ, M. V. R. Final irrigation protocols may affect intraradicular dentin ultrastructure. **Clin Oral Invest.** *In press.* 2016

WALTER, R.; MIGUEZ, P. A.; ARNOLD, R. R.; PEREIRA, P. N. R.; DUARTE, W. R.; YAMAUCHI, M. E. Effects of natural cross-linkers on the stability of dentin collagen and the inhibition of root caries in vitro. **Caries Res.** v. 42, p. 263-68, 2008.

WANG, Z.; MAEZONO, H.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Evaluation of root canal dentin erosion after different irrigation methods using energy-dispersive X-ray spectroscopy. **J Endod.** v. 42, n. 12, p. 1834-39, 2016

YASSEN, G. H.; ECKERT, G. J.; PLATT, J. A. Effect of intracanal medicaments used in endodontic regeneration procedures on microhardness and chemical structure of dentin. **Restor Dent Endod.** v. 40, n. 2, p. 104-12, 2015.

YASSEN, G. H.; PLATT, J. A.; HARA, A. T. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. **J Oral Science**, v. 53, n. 3, p. 273-282, 2011.