Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora

ANA BÁRBARA DE ARAÚJO LOIOLA

Efeito da reumidificação da dentina com quitosana sobre a resistência adesiva, composição química e morfologia da interface dentina/resina

Ribeirão Preto
2016

ANA BÁRBARA DE ARAÚJO LOIOLA

Efeito da reumidificação da dentina com quitosana sobre a resistência adesiva, composição química e morfologia da interface dentina/resina

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

Área de concentração: Odontologia Restauradora -
Dentística

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silmara Aparecida Milori
Corona

Ribeirão Preto
2016

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

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

Loiola, Ana Bárbara de Araújo.

Efeito da reumidificação da dentina com quitosana sobre a resistência adesiva, composição química e morfologia da interface dentina/resina. Ana Bárbara de Araújo Loiola; orientadora Prof.^a Dr.^a Silmara Aparecida Milori Corona. Ribeirão Preto, 2016.
84f. : il.; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto / USP. Área de concentração: Odontologia Restauradora – Opção: Dentística.

1. Adesivo dentinário 2. Dentina. 3. Quitosana. 4. Microscopia eletrônica de varredura.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: LOIOLA, Ana Bárbara de Araújo

Título: Efeito da reumidificação da dentina com quitosana sobre a resistência adesiva, composição química e morfologia da interface dentina/resina

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

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, **Tomás** e **Inêz** que estiveram todo o tempo ao meu lado, me incentivando e dando forças para que eu alcançasse meu objetivo. Muito obrigada por tudo.

AMO VOCÊS!!

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus, por me guiar na escolha de meus caminhos, me dar força e determinação para superar todas as dificuldades encontradas.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Silmara Aparecida Milori Corona, pela confiança, dedicação e disposição em me auxiliar sempre que preciso. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntas e por tudo que me ensinou nesse período.

À professora Prof.^a Dr.^a Aline Evangelista Souza-Gabriel, pela receptividade e disposição em me ajudar em tudo que precisei. Obrigada pela amizade e pelos ensinamentos durante esses anos.

À todos os meus colegas de pós-graduação, que de alguma forma contribuíram para meu enriquecimento como estudante e profissional.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, representada pela Professora Doutora Léa Assed Bezerra da Silva Diretor e pelo Vice-Diretor Prof. Dr.Arthur Belém Novaes Júnior.

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

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 Sousa Neto.

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

Aos Profs. Drs. César Bataglion, Luiz Carlos Pardini, Manoel Damião de Sousa Neto, Marcelo Mazzeto, Marco Antonio Moreira Rodrigues da Silva, Maria Cristina Borsatto, Mônica Campos Serra, Regina Guenka Palma-Dibb, Ricardo Gariba Silva, Silmara Aparecida Milori Corona, pela agradável convivência nas disciplinas e pelos conhecimentos transmitidos durante a pós-graduação.

Às Profas. Dras. Rita de Cássia Loiola Cordeiro e Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto, que me orientaram durante a graduação, transmitiram grandes ensinamentos e de alguma forma contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Gallo, pela valiosa colaboração na análise estatística deste trabalho.

Aos colegas Júlia, Juliana Faraoni, Carolina, Rodrigo, Mariana, Mirian, Fabiana, Silvana, Izabela, Késsia e os demais alunos que compartilharam muitos momentos comigo durante esse período, obrigada pelo convívio e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

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

À técnica Patrícia Marchi, do Laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pela amizade, paciência e disponibilidade em auxiliar com os aparelhos no laboratório e preparar as soluções sempre que precisei.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pela atenção e disposição.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pelo apoio constante e dedicação aos alunos.

Ao CNPq pela concessão bolsa de estudo e auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho, maior dedicação ao curso de pós-graduação e a possibilidade da realização de mais um dos meus objetivos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.

Επίγραφε

“Knowing is not enough, we must apply. Willing is not enough, we must do.”

Goethe

Resuma

RESUMO

LOIOLA, A.B.A. *Efeito da reumidificação da dentina com quitosana sobre a resistência adesiva, composição química e morfologia da interface dentina/resina*. 2016. 84 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A utilização de biopolímeros na dentina desmineralizada tem sido analisada com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas e estruturais da dentina previamente ao procedimento restaurador. Este estudo *in vitro* avaliou o efeito da reumificação da dentina com quitosana em diferentes concentrações sobre a resistência adesiva, composição química da dentina e morfologia da interface dentina/resina. Os fatores em estudo foram substrato dentinário em dois níveis: hígido e desmineralizado; e reumidificação da dentina em quatro níveis: quitosana a 2,5%, quitosana a 5,0%, ácido acético a 1,0% (placebo) e ausência de reumidificação (controle). Oitenta dentes bovinos foram seccionados no terço médio da coroa para obtenção dos espécimes de dentina (7,0 X 7,0 mm). Os espécimes foram planificados e polidos, e então foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n=10). Metade dos espécimes foi submetida à indução de cárie artificial pelo método de ciclagem de pH (8h em solução desmineralizante com pH 4.8 e 16 horas em solução remineralizante com pH 7.0) e então, foram subdivididos de acordo com a reumidificação da dentina. Os espécimes foram restaurados e o conjunto dente/restauração foi seccionado a fim de ser obter 6 palitos com área transversal de $1,0 \pm 0,2 \text{ mm}^2$, que foram submetidos a análise quantitativa (MPa) da resistência de união a microtração. Três espécimes de cada grupo foram desidratados em grau ascendente de etanol e submetidos à análise dos níveis de cálcio e fósforo da superfície dentinária por meio de espectroscopia eletrônica de análise química (EDS) e análise qualitativa da interface adesiva por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados obtidos da análise de microtração foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e apresentaram diferença estatisticamente significativa para o tipo de substrato dentinário ($p=0,00001$) e para reumidificação da dentina ($p=0,0105$). O teste de Tukey encontrou que para o tipo de substrato, a dentina hígida apresentou maior resistência adesiva e que a dentina reumidecida com quitosana a 2,5% apresentou maior resistência adesiva quando comparada a quitosana a 5,0%, ácido acético a 1,0% ou ausência de reumidificação. O teste de Kruskal Wallis encontrou diferença significativa para os níveis de cálcio ($p=0,036$) e fósforo ($p=0,019$) encontrados na análise de EDS. O teste de Mann-Whitney mostrou que em substrato desmineralizado a

reumidificação com ácido acético a 1,0% e quitosana a 2,5% apresentou maiores concentrações de ambos os minerais. As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram partículas de quitosana no interior dos túbulos dentinários, sendo que a reumidificação da dentina desmineralizada com quitosana a 5,0% apresentou maior quantidade de partículas. A reumidificação da dentina com quitosana não influenciou a morfologia da interface dentina/resina, no entanto, a reumidificação da dentina desmineralizada com quitosana a 2,5% gerou alterações na composição química da dentina e proporcionou maior força de adesão.

Palavras-chave: adesivo dentinário, dentina, quitosana, microscopia eletrônica de varredura.

Abstract

ABSTRACT

LOIOLA, A. B. A. Rewetting of demineralized dentin with chitosan: Effect on bond strength, chemical composition and morphology of dentin/resin interface. 2016. 84 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The use of biopolymers in demineralized dentin has been investigated with the aim of improving the mechanical and structural properties of dentin prior to restorative procedure. The purpose of this study was to evaluate the rewetting of dentin with chitosan at different concentrations, on bond strength, chemical composition and morphology of dentin/resin interface. The factors under evaluation were: dentin substrate at two levels: sound and demineralized; and dentin rewetting at four levels - 2.5% chitosan, 5.0% chitosan, 1.0% acetic acid (placebo) and no rewetting (control). Eighty specimens of bovine dentin (7x7 mm) were randomly assigned into 8 groups (n=10). Half of dentin slabs were submitted to cariogenic challenge (8h in demineralizing solution and 16h in remineralizing solution) and then, were subdivided according to rewetting of dentin. The specimens were restored and each tooth was sectioned in order to obtain 6 sticks with cross-sectional area of $1.0 \pm 0.2 \text{ mm}^2$, which were submitted to microtensile bond strength test (μTBS). Three specimens of each group were dehydrated in ethanol and submitted to analysis of calcium and phosphorus levels of dentin surface by electron spectroscopy of chemical analysis (EDS) and qualitative analysis of interface under scanning electron microscopy (SEM). For data obtained on microtensile bond strength test, ANOVA showed significant difference between dentin substrates ($p=0.00001$) and dentin rewetting ($p=0.0105$). Tukey test showed that for dentin substrate, sound dentin had greater bond strength than demineralized dentin and the rewetting with 2.5% chitosan provided higher bond strength than 5.0% chitosan, 1.0% acetic acid or no rewetting. Kruskal Wallis test found significant difference for calcium ($p=0.036$) and phosphorus ($p=0.019$) levels found in EDS analysis. Mann-Whitney test showed that in demineralized dentin, the rewetting with 1.0% acetic acid and 2.5% chitosan had higher concentration of both minerals. SEM analysis showed particles of chitosan within the dentinal tubules, specially when 5.0% chitosan were used. Dentin rewetting with chitosan did not changed the morphology of dentin/resin interface, however, the rewetting of demineralized dentin with 2.5% chitosan modified the chemical composition and provided better substrate for adhesive procedures, resulting in higher bond strength.

Keywords: dentin adhesive, dentin, chitosan, scanning electron microscopy.

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução.....	35
2. Proposição.....	41
3. Materiais e Métodos.....	45
4. Resultados.....	57
5. Discussão.....	65
6. Conclusão.....	71
Referências Bibliográficas.....	75

Introdução

INTRODUÇÃO:

O procedimento restaurador deve ser visto como parte do tratamento, aliado a medidas de prevenção e promoção de saúde. Ao longo dos anos, cavidades mais conservadoras se sobrepuseram aos desgastes desnecessários, oriundos das extensões preventivas e dos preparos cavitários com formas geométricas pré-estabelecidas, limitando-se, praticamente, a extensão do processo carioso. Os materiais utilizados em odontologia restauradora também passaram por mudanças notáveis. O advento da odontologia adesiva permitiu não só o estabelecimento de medidas preventivas, como o selamento de fossas e fissuras, mas também a realização de restaurações menos invasivas e altamente estéticas (Seeman et al., 2014). Assim, a distinção clínica entre o que deve ser removido e o que pode ou convém ser preservado durante a remoção do tecido cariado torna-se importante (Massara et al., 2002).

A remoção seletiva do tecido cariado tem como vantagens remover o mínimo possível de estrutura dentária remanescente sadia, evitando desgastes desnecessários e favorecendo os procedimentos adesivos (Kidd, 2004). Neste conceito, há a preservação da dentina afetada, que possui menor concentração de minerais devido ao processo de desmineralização durante a formação da lesão de cárie (Marshall et al., 2001; Van der Veen et al., 1996), mas é passível de remineralização (Kidd, 2004; Thompson et al., 2008). Por esse motivo, a remineralização da dentina afetada se torna importante para a preservação da estrutura dental (Christensen et al., 2005). Atualmente, ainda é um desafio a remineralização da dentina remanescente em lesões de cárie, bem como a adesão dos materiais restauradores, devido a composição química e estrutural do tecido dentinário.

A dentina é um tecido biológico caracterizado por uma matriz orgânica mineralizada. Em volume, 50% de sua composição é formada por minerais, enquanto 30% é conteúdo orgânico e o restante água (Linde e Goldberg, 1993). O conteúdo orgânico é composto principalmente por colágeno tipo I que se encontra organizado como uma densa trama de fibrilas interconectadas, ao passo que o conteúdo mineral da dentina é formado por cristais minerais de apatita que se depositam em regiões intra e extrafibrilares (Kinney et al., 2003). Devido à presença abundante de matriz orgânica, o processo de remineralização torna-se mais difícil, quando comparado ao esmalte (Chen et al., 2015).

Buscando reforçar a matriz de colágeno da dentina, a incorporação de biopolímeros tem sido estudada (Sherestha et al., 2011; Profeta et al., 2012; Daoood et al., 2013; Fawzy et al., 2013; Persadmehr et al., 2014; Kishen et al., 2016). A quitosana é um biopolímero

policatiônico obtido por meio de desacetilação alcalina da quitina que vem sendo bastante estudado na área biomédica por apresentar características como biocompatibilidade e biodegradabilidade (Fawzy et al., 2013; Perchyonok et al., 2013). A utilização de quitosana tem sido proposta em várias aplicações médicas, como na regeneração de tecidos epiteliais (Maia et al., 2006; Cho et al., 2007), promoção de osteogênese (Murugan e Ramakrishna, 2004) e absorção de gorduras e redução o colesterol (Gades e Stern, 2005).

A utilização de quitosana também tem sido estudada na área odontológica, pois além de ser biocompatível, apresenta potente atividade antimicrobiana (Rabea et al., 2003; Elsaka e Elnaghy, 2012) e baixa toxicidade aos tecidos (Rinaudo, 2006; Raafat e Sahl, 2009). Em ambientes ácidos os grupos amina da quitosana capturam íons hidrogênio, resultando em carga global positiva, o que lhe confere sua capacidade bioadesiva a moléculas carregadas negativamente, como a superfície dental (Sezer et al., 2008). Devido a sua biocompatibilidade e propriedades funcionais, a quitosana apresenta amplo potencial para aplicação como biomaterial na área odontológica (Arnaud et al., 2010).

Além disso, a quitosana pode melhorar a remineralização pela deposição de íons cálcio e fósforo sobre a superfície desmineralizada e controlar a desmineralização pela inibição de perdas minerais (Arnaud et al., 2010). O controle da desmineralização é influenciado pela concentração e o tempo de exposição do biopolímero sobre a superfície e o melhor desempenho é obtido em concentrações de 2,5% e 5,0 % e em tempos de exposição entre 60 e 90 segundos (Arnaud et al., 2010). Assim, a utilização deste biopolímero na tentativa de obter propriedades de superfície favoráveis à deposição de minerais torna-se um método promissor para remineralização de lesões em esmalte e dentina (Xu et al., 2011).

A quitosana é também utilizada como agente reumidificante da dentina, uma vez que a dentina condicionada com ácido fosfórico apresenta menor molhamento (Farge et al., 2010) e menor energia de superfície (Erickson, 1992). A diminuição do molhamento da dentina condicionada pode interferir no processo de adesão uma vez que a força adesiva é dependente da hidratação do substrato (Toledano et al., 2004).

Além disso, no processo de hibridização da dentina pode haver discrepância entre a profundidade de ação do ácido e a profundidade de penetração do adesivo na matriz de colágeno (Hashimoto et al., 2004; Peumans et al., 2014), devido a infiltração incompleta dos monômeros na dentina desmineralizada, deixando uma camada de colágeno exposta na base da camada híbrida (Hashimoto et al., 2000), a qual fica susceptível a degradação hidrolítica e enzimática mediada pelas metaloproteinases da dentina (Pashley et al., 2004; Hebling et al.,

2005; Brackett et al., 2009; Ricci et al., 2014). A utilização da quitosana após o condicionamento ácido da dentina aumenta a resistência à biodegradação enzimática devido à neutralização das metaloproteinases da dentina (Fawzy et al., 2013) e melhora as propriedades mecânicas e a estabilidade estrutural, uma vez que a quitosana é capaz de formar arranjos interfibrilares com matrizes protéicas como o colágeno (Daoood et al., 2013). Estudos avaliaram o efeito do tratamento da dentina com quitosana e verificaram aumento da força de adesão imediata (Fawzy et al., 2013; Perchyonok et al., 2013) e melhora na infiltração do adesivo na dentina hígida (Daoood et al., 2013).

Frente aos benefícios propiciados pela quitosana na estrutura dental e devido a inexistência de estudos que estabeleçam a concentração ideal para utilização da quitosana como agente reumidificante da dentina desmineralizada, o presente estudo avaliou o efeito da reumidificação da dentina com quitosana em diferentes concentrações sobre a resistência adesiva, composição química e morfologia da interface dentina/resina.

Proposição

PROPOSIÇÃO:

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a reumidificação da dentina com quitosana em diferentes concentrações. Para tanto, o trabalho foi dividido em objetivos específicos, onde foram avaliadas:

- 1) Resistência de união da interface adesiva por meio de teste de microtração (MPa), seguida da análise do padrão de fratura.
- 2) Composição química da dentina por meio de Espectrometria eletrônica de análise química (EDS).
- 3) Morfologia da interface adesiva em microscopia eletrônica de varredura.

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS:

Delineamento Experimental

Os fatores em estudo foram substrato dentinário em dois níveis: hígido e desmineralizado; e reumidificação da dentina em quatro níveis: quitosana a 2,5%, quitosana a 5,0%, ácido acético a 1,0% (placebo) e ausência de reumidificação (controle). A amostra do experimento foi composta por 80 espécimes de incisivos bovinos divididos aleatoriamente em oito grupos (n=10). As variáveis de resposta foram: 1) análise quantitativa (MPa) da resistência de união a microtração; 2) análise quantitativa (%) dos níveis de cálcio e fósforo da superfície dentinária por meio de espectroscopia eletrônica de análise química (EDS) e 3) análise qualitativa da interface adesiva por meio microscopia eletrônica de varredura. O desenho experimental do estudo está representado na Figura 1.

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo.

Seleção dos dentes

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

Preparo da amostra

Os dentes foram seccionados transversalmente na junção amelocementária para separar as coroas das raízes, utilizando disco diamantado montado em máquina de corte (Isomet 1000; Buehler, Alemanha). Posteriormente, as coroas dentais foram seccionadas longitudinalmente no sentido mésio-distal. A hemi-seção da face vestibular da coroa de cada dente foi seccionada de forma a se obter um fragmento de 7 mm x 7 mm da face vestibular de cada coroa.

Os fragmentos dentais foram devidamente fixados em matrizes de teflon utilizando-se cera fundida, de forma que as superfícies de dentina permanecessem voltadas para o meio externo. Posteriormente, as superfícies foram polidas em Politriz giratória (DP-9U2; Struers S/A, Copenhagen, Dinamarca) refrigerada à água com lixas d'água de granulação 1200 (Hermes 12 Abrasives Ltd., VA, EUA) e pasta de alumina 0.3- μ m (Arotec S/A Ind. Com., São Paulo, Brasil) em feltro polidor (ATM, Altenkirchen, Alemanha) (Hara et al., 2006).

Figura 2 – Incisivos bovinos: (a) profilaxia dental (b) Incisivo bovino em posição para corte na junção amelo-cementária; (c) incisivo seccionado; (d) coroa fixada para realização de novos cortes para obtenção dos espécimes.

Figura 3 – Secção dos espécimes: (a) Espécimes seccionados, sem planificação e polimento; (b) Espécimes planificados e polidos.

Divisão dos grupos experimentais

Os 80 espécimes de dentina foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos de acordo com o substrato dentinário: hígido e desmineralizado; e a reumidificação da dentina:

quitosana a 2,5%, quitosana a 5,0%, ácido acético a 1,0% e ausência de reumidificação (controle), como representado na Figura 1.

Indução das lesões de cárie artificiais

Metade dos espécimes foi submetida a desafio cariogênico para indução de lesões de cárie artificiais em dentina, que foram criadas por ciclagem do pH, segundo protocolo descrito por Markezan et al., 2009 . A solução desmineralizante foi composta por 2 mM de CaCl_2 , 2.2 mM de NaH_2PO_4 e 50 mM de ácido acético com pH ajustado para 4.8. A solução remineralizante continha 1.5 mM de CaCl_2 , 0.9 mM de NaH_2PO_4 e 0.15M de KCl com pH em torno de 7.0. Cada espécime foi ciclado em 10 mL de solução, sendo 8h em solução desmineralizante e 16h em solução remineralizante. Este procedimento foi realizado por 14 dias em temperatura ambiente.

Preparo das soluções de quitosana

Para preparo da solução de quitosana a 2,5% foram pesadas em balança analítica 2,5 gramas de quitosana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) de baixo peso molecular (75-85% de desacetilação) (Chung et al., 2014) que foi adicionada lentamente a 100 mL de solução de ácido acético a 1,0%, sob agitação magnética (Marconi Equip. Lab. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) durante 20 min de agitação (tempo suficiente para solubilizar o polissacarídeo). A fim de evitar a agregação das partículas e elevar o pH da solução (pH = 4,3), foi adicionado 1 mol/L de solução NaOH (Daood et al., 2013; Fawzy et al., 2013). O preparo da solução de quitosana a 5,0% foi realizado da mesma forma, no entanto, foram utilizados 5 gramas para preparo de 100 ml de solução.

Figura 4 – Quitosana: (a) Quitosana utilizada para o preparo das soluções; (b) Aplicação da quitosana com auxílio de seringa; (c) Seringa utilizada para aplicação da quitosana.

Procedimento restaurador

Em todos os espécimes, foi realizado o condicionamento da dentina com ácido fosfórico 37% (Condac 37 FGM, Joinville, SC, Brasil) por 15 segundos, seguido de lavagem com água destilada pelo mesmo tempo e secagem com papel absorvente.

Para espécimes que receberam a reidratação da dentina, este procedimento foi realizado com quitosana a 2,5% e 5,0% e ácido acético a 1,0%, que foram aplicadas com auxílio de seringa, recobrindo toda a dentina e permaneceu na superfície por 1 minuto (Arnaud et al., 2010), seguida por secagem com papel absorvente. Nos espécimes do grupo controle não foi realizado este procedimento.

De acordo com as normas do fabricante, foram aplicadas duas camadas do adesivo (Adper Single Bond 2, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) com microbrush nº 2 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) de forma ativa com posterior evaporação do solvente e fotopolimerização com aparelho de LED a 1200 mW/cm² (Gnatus Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 10 segundos. As superfícies de dentina foram restauradas com resina composta Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), incluída em pequenos

incrementos com auxílio de espátula nº 1 (Duflex SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), seguidos de fotopolimerização por 20 segundos.

Figura 5 - Materiais utilizados durante o procedimento restaurador: (a) Ácido fosfórico à 37% Condac 37 (FGM); (b) Resina composta Filtek Z250 XT (3M ESPE); (c) Adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE); (d) Fotopolimerizador de LED a 1200 mW/cm² (Gnatus).

Figura 6 – Procedimento restaurador: (a) Espécime inicial; (b) Aplicação de ácido fosfórico 37%; (c) Lavagem do ácido fosfórico; (d) Reumidificação da dentina; (e) Aplicação do adesivo; (f) Acomodação da resina composta no espécime; (g) Espécime restaurado.

Secção dos espécimes

Os espécimes (conjunto dentina/restauração) foram seccionados com irrigação constante no sentido oclusopulpar em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Primeiramente, os fragmentos foram seccionados resultando em dois fragmentos com medidas de 5 X 7 mm e 2 X 7 mm. O menor fragmento (2 X 7 mm) foi utilizado para as análises de EDS e microscopia eletrônica de varredura, para as quais foram selecionados 3 espécimes por grupo (n=3).

O outro fragmento do espécime (5 X 7 mm) foi submetido ao teste de microtração. Para isto, foram realizados novos cortes em cortadeira de precisão, onde as extremidades da restauração foram descartadas e foram obtidos no mínimo 6 palitos de $1,0 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ de área transversal, extraídos da porção central do espécime (Profeta et al., 2012). A espessura do fragmento foi confirmada com um paquímetro digital (Mitutoyo, Toquio, Japão). Seis palitos foram destinados ao teste de resistência de união a microtração (n=10 - 60 palitos por grupo).

Figura 7 – Secção dos palitos para o teste de microtração: (a) Espécime restaurado posicionado em máquina de corte; (b) Primeiras secções em único sentido; (c) palitos seccionados.

Ensaio de resistência de união a microtração (μ TBS)

Os espécimes foram posicionados na máquina universal de ensaios (Instron Corporation, Canton-Massachusetts, EUA) com célula de carga de 50Kg/f, fixados em dispositivo de aço inoxidável com adesivo cianoacrílico (Super Bonder; Henkel Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e submetidos a força de tração com velocidade de 0,5 mm/min até a falha. Os valores de resistência adesiva foram expressos em megapascal (MPa),

fornecidos pelo programa por meio do cálculo das secções transversais dos palitos, medidas previamente ao teste.

As superfícies envolvidas na fratura de cada espécime foram analisadas em lupa esteroscópica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para classificação quanto ao padrão de fratura. Foram classificadas em adesiva, quando a superfície dentinária se encontrava coberta por fina camada de material adesivo; coesiva do material, quando a superfície se encontrava coberta por resina composta; coesiva do substrato, quando a falha ocorreu na dentina; e mista, nas situações em que houve a combinação dos tipos adesiva e coesiva.

Figura 8 – Teste de microtração: (a) Palito fixado ao dispositivo com adesivo à base de cianocrilato; (b) Dispositivo posicionado na máquina de ensaio; (c) Palito fixado ao dispositivo previamente ao teste; (d) Palito fraturado após o teste.

Espectroscopia Eletrônica de Análise Química (EDS) e MEV da superfície dentinária

Os fragmentos destinados as análises espectroscopia eletrônica de análise química e microscopia eletrônica de varredura foram fixos em anéis de resina acrílica e tiveram a superfície polida com lixa d'água de granulação decrescente (#600 e 1200) e pano de polimento úmido em fibra sintética (Bueher, São Paulo, SP, Brazil) com pastas de alumina de granulação de 0,3 μm (Bueher, São Paulo, SP, Brazil).

Foram então lavados, secos e fixos em stubs com fita dupla-face de carbono e levados ao Microscópio Eletrônico de Varredura com detector de Espectrometria de Energia Dispersiva (EDS) acoplado (EVO 50; Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra) pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Ribeirão Preto, SP e as percentagens de cálcio e fósforo foram determinadas.

Na sequência, os espécimes foram imersos em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Biodinâmica, Paraná, Brasil) por 10 minutos, seguido de lavagem em água destilada por 10 minutos e então foram submetidos à desidratação em etanol de 25%, 50%, 75%, 95% GL, mediante imersão por 20 minutos em cada solução, finalizando com a imersão, por 1 h, em etanol 100%. Em seguida foram submetidos à desidratação química por meio de imersão em solução de hexametildisilazane (HDMS). Finalizada a desidratação, foram fixados novamente em stubs metálicos e cobertos com fina camada da liga ouro-paladium em aparelho de metalização a vácuo (Bal- Tec AG, Balzers, Liechtenstein).

Foi realizada a varredura de toda superfície dentinária e, em seguida, as áreas mais representativas de cada grupo foram fotografadas em aumento de duas mil vezes (2000X).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com os Conceitos da Estatística Clássica, após análise exploratória dos dados. Para os dados obtidos da análise de microtração, houve homogeneidade de variância e distribuição normal das curvas do modelo matemático e por esse motivo a avaliação quantitativa dos dados foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA). Comparações múltiplas foram realizadas através do teste complementar de Tukey com nível de significância 0,05. Para análise dos dados obtidos na

análise de EDS, não houve homogeneidade de variância e distribuição normal da amostra, então foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, não paramétrico. Comparações múltiplas foram realizadas utilizando o teste complementar de Mann-Whitney. A análise estatística foi realizada utilizando software SPSS, versão 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Resultados

RESULTADOS:

Teste de resistência adesiva

A análise dos resultados de microtração mostrou que houve diferença estatisticamente significativa para o tipo de substrato dentinário ($p=0,00001$), em que o substrato hígido apresentou maior resistência adesiva, independente dos tratamentos realizados; e para a reumidificação da dentina ($p=0,0105$), onde o grupo tratado com quitosana a 2,5% obteve maior resistência adesiva ($33,38 \pm 9,38a$) quando comparado a quitosana 5,0% ($28,81 \pm 7,92b$), ácido acético a 1,0% ($24,54 \pm 8,82b$) ou ausência de reumidificação (controle) ($29,62 \pm 9,63b$).

Não houve diferença estatisticamente significativa para a interação dos fatores (tratamento X substrato). Os valores médios e desvio padrão de resistência adesiva (MPa) obtidos no teste de microtração estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão de resistência adesiva (MPa) para o substrato dentinário reumidificado com diferentes soluções.

	Dentina hígida	Dentina desmineralizada
Ausência de reumidificação	$27,28 \pm 11,43^{Ab}$	$12,81 \pm 5,11^{Bb}$
Ácido acetico a 1,0%	$26,03 \pm 10,78^{Ab}$	$14,88 \pm 4,14^{Bb}$
Quitosana a 2,5%	$36,04 \pm 13,60^{Aa}$	$23,10 \pm 4,82^{Ba}$
Quitosana a 5,0%	$27,16 \pm 8,72^{Ab}$	$15,92 \pm 4,96^{Bb}$

*Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre linhas e as letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre colunas.

Após o teste de microtração, os fragmentos foram analisados em lupa estereoscópica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para classificação do padrão de fratura. Houve a predominância do tipo de fratura adesiva (Gráfico 1), seguido pela fratura coesiva em dentina,

tanto para substrato hígido quanto para desmineralizado, para todos os métodos de reumidificação da dentina avaliados.

Gráfico 1 – Porcentagem do padrão de fratura para os espécimes estudados.

Análise química da superfície em EDS

Houve diferença significativa para os níveis de cálcio ($p=0,036$) e fósforo ($p=0,019$). Em substrato hígido os níveis de cálcio e fósforo foram semelhantes, para os diferentes métodos de reumidificação. Em dentina desmineralizada os níveis de cálcio e fósforo foram maiores para a reumidificação com ácido acético a 1,0% e para quitosana a 2,5%. Os dados obtidos na análise de EDS em relação às concentrações de Ca e P estão representados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 - Valores das medianas de cálcio na subsuperfície dentinária nos diferentes métodos de reumidificação da dentina.

	Dentina hígida	Dentina desmineralizada
Ausência de reumidificação	20,45 ^a	22,45 ^{ab}
Ácido acetico a 1,0%	22,35 ^a	28,23 ^{bc}
Quitosana 2,5%	20,60 ^a	28,46 ^c
Quitosana 5,0%	20,27 ^a	24,27 ^{abc}

*Letras minúsculas distintas indicam diferenças significantes.

Tabela 3 - Valores das medianas de fósforo na subsuperfície dentinária nos diferentes métodos de reumidificação da dentina.

	Dentina hígida	Dentina desmineralizada
Ausência de reumidificação	10,55 ^a	11,85 ^{ab}
Ácido acetico a 1,0%	11,87 ^a	14,07 ^{bc}
Quitosana 2,5%	10,75 ^a	14,75 ^c
Quitosana 5,0%	10,27 ^a	12,27 ^{ab}

*Letras minúsculas distintas indicam diferenças significantes.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Figura 9, as imagens de microscopia eletrônica de varredura representam as amostras de dentina hígida, nos diferentes grupos. Em todas as imagens podemos observar camada híbrida uniforme e dentina com túbulos dentinários expostos. As imagens A e B apresentam características bem semelhantes, sugerindo que o ácido acético a 1,0% não alterou a superfície dentinária. Nas imagens C e D podemos verificar que a aplicação de quitosana a 2,5% e 5,0%, respectivamente, proporcionou deposição de partículas de quitosana no interior dos túbulos dentinários. Todos os espécimes foram condicionados com ácido fosfórico 37%, que foi o responsável pela exposição dos túbulos dentinários.

Na Figura 10, as imagens de microscopia eletrônica de varredura representam as amostras de dentina desmineralizada, nos diferentes grupos. A imagem A representa o grupo controle e apresenta dentina bastante desmineralizada, com descontinuidade do tecido e fendas entre a camada híbrida e a dentina. A imagen B apresenta camada híbrida uniforme e pequena fenda indicando falha de união à dentina. As imagens C e D representam os grupos tratados com quitosana a 2,5% e 5,0%, respectivamente, e, assim como ocorreu em dentina hígida, podemos observar deposição de partículas de quitosana no interior dos túbulos dentinários, sendo que no grupo tratado com quitosana 5,0% a concentração de partículas foi maior.

Figura 9. Fotomicrografias da dentina hígida condicionada com ácido fosfórico após os diferentes métodos de reumidificação realizados: A) sem reumidificação (controle); B) ácido acético a 1,0%; C) quitosana a 2,5%; D) quitosana 5,0%. Setas representam partículas de quitosana no interior dos túbulos dentinários. RC: resina composta; CH: camada híbrida; D: dentina.

Figura 10. Fotomicrografias da dentina desmineralizada condicionada com ácido fosfórico após os diferentes métodos de reumidificação realizados: A) sem reumidificação (controle); B) ácido acético a 1,0%; C) quitosana a 2,5%; D) quitosana 5,0%. Setas representam partículas de quitosana no interior dos túbulos dentinários; *representam fendas entre camada híbrida e dentina; RC: resina composta; CH: camada híbrida; D: dentina.

Discussão

DISCUSSÃO:

A utilização de agentes reumidificantes em dentina desmineralizada busca melhorar as propriedades deste tecido frente ao procedimento restaurador. No presente estudo, a reumidificação da dentina com quitosana a 2,5% apresentou melhores resultados para resistência a união quando comparada à quitosana a 5,0%, ácido acético a 1,0% e ausência de reumidificação. Quanto à análise do padrão de fratura, houve predominância de fratura adesiva, tanto em dentina hígida quanto desmineralizada, para todos os métodos de reumidificação avaliados.

A quitosana é capaz de formar arranjos interfibrilares que reforçam a matriz de colágeno e, assim, atua preservando a integridade estrutural e melhorando as propriedades mecânicas (Daood et al., 2013; Fawzy et al., 2013; Kishen et al., 2016). Além disso, a quitosana é capaz de neutralizar as metaloproteinases da dentina (Persadmehr et al., 2014). A atuação das metaloproteinases sobre as fibrilas de colágeno expostas na união resina-dentina é atualmente reconhecida como um importante mecanismo de degradação dessas interfaces (Hebling et al., 2005). Tanto a degradação do colágeno quanto da resina aumenta a quantidade de água na interface adesiva, causando degradação e efeitos deletérios na longevidade da restauração (Breschi et al., 2008).

Por esse motivo, o colágeno modificado por quitosana pode ter uma característica benéfica para restaurações adesivas (Daood et al., 2013). Perchyonok et al. (2013) encontraram que a utilização da quitosana a 5,0% previamente ao procedimento restaurador resultou em maior força de adesão após 24 horas, quando comparado aos grupos em que utilizaram sistema adesivo convencional. No entanto, após 6 meses, a força de adesão foi semelhante para todos os grupos.

Embora a quitosana apresente diversos efeitos benéficos à estrutura dental e interface adesiva, quando utilizada em altas concentrações, pode afetar a infiltração da resina e dificultar o processo de adesão (Daood et al., 2013). Sabe-se que para o sucesso de restaurações adesivas é necessário que os espaços interfibrilares estejam abertos, propiciando a penetração da resina por entre as fibrilas de colágeno da dentina intertubular e formação da camada híbrida (Gwinnett, 1993; VanMeerbeek et al., 1993). Observando as imagens da MEV podemos verificar que a utilização de quitosana a 2,5% e a 5,0% como agente reumidificante da dentina não resultou em alterações morfológicas na interface adesiva, no entanto, gerou deposição de partículas no interior dos túbulos dentinários, e esta foi maior quando utilizou-se a quitosana a 5,0 %. Esta agregação de partículas de quitosana na matriz de colágeno, quando

em grande quantidade, oblitera os espaços interfibrilares e interfere no processo de adesão, reduzindo a força de união, o que justifica os menores valores de resistência adesiva quando utilizada a quitosana a 5,0%.

Neste sentido, estudos avaliaram o efeito da quitosana associada à riboflavina e encontraram que na proporção 1:4 houve estabilização da matriz colágena, com melhor penetração da resina e formação da camada híbrida (Daood et al., 2013), resultando em melhor resistência adesiva (Fawzy et al, 2013). No entanto, nas proporções 1:1 e 4:1, houve redução da força de adesão, decorrentes de menor infiltração de resina e alterações morfológicas na camada híbrida (Fawzy et al., 2013).

Assim como a profundidade de infiltração da resina, a molhabilidade também possui um importante papel na qualidade e na durabilidade da interface resina-dentina. Ao avaliar o efeito da reumidificação da dentina com soluções de quitosana, Ururahy (2016) encontrou que a quitosana não influenciou na molhabilidade do substrato dentinário, o que reforça a ideia de que este biopolímero pode ser utilizado para restabelecer a reidratação da matriz colágena exposta, com a manutenção de uma superfície possivelmente mais hidrofílica após o condicionamento ácido, tornando-a mais favorável à adesão. Além disso, em ambiente ácido, a quitosana captura íons hidrogênio produzindo cargas positivas, o que resulta em uma capacidade bioadesiva frente às cargas negativas de substratos como o colágeno (Sezer et al., 2008; Arnaud et al., 2010).

A determinação das alterações do conteúdo mineral, resultantes da desmineralização e remineralização nos tecidos dentais duros, é importante em vários estudos na odontologia, especialmente na área de cariologia (Arnaud et al., 2010). Estudos prévios encontraram que o tratamento com quitosana influencia o processo des-remineralização tanto em esmalte (Arnaud et al., 2010) quanto em dentina (Xu et al., 2011), no entanto, tem maior ação na inibição de perda mineral e menor efeito na reposição de minerais e, por esse motivo, apresentou melhores resultados quando realizado previamente aos desafios cariogênicos (Arnaud et al., 2010).

Segundo Xu et al. (2011), as propriedades de superfície de dentina parcialmente desmineralizado não favorecem a nucleação de cristais. No entanto, a quitosana aplicada sobre a dentina forma arranjo interfibrilares com a matriz de colágeno, resultando em uma superfície mais negativamente carregada e com menor energia livre, o que resulta na deposição de íon minerais sobre a superfície de dentina parcialmente desmineralizada.

Através da análise de EDS observou-se que a porcentagem de cálcio e fósforo presente na dentina hígida foi similar para todos os grupos, no entanto, os valores diferiram quando

comparados aos níveis de cálcio e fósforo em substrato desmineralizado reumidificado com ácido acético a 1,0% e quitosana a 2,5%, o que sugere que estes métodos de reumidificação da dentina foram mais eficazes em substrato desmineralizado.

A remineralização do substrato desmineralizado é um fator importante ao se realizar o procedimento restaurador, já que este apresentou menores valores de resistência de união quando comparado ao substrato hígido. A dentina desmineralizada difere da dentina hígida em vários aspectos, como coloração, dureza, capacidade de remineralização e composição molecular (Ricci et al., 2014). É um tecido com menos minerais e maior porosidade e estas variações estruturais representam um desafio para adesão dos materiais restauradores (Sacramento et al., 2012).

A utilização da quitosana associada à materiais dentários também tem sido estudada. A incorporação de quitosana ao cimento de ionômero de vidro (Abraham et al., 2014) e aos sistemas adesivos (Diolosa et al., 2014) tem mostrado resultados promissores na qualidade e durabilidade da interface adesiva. Quando adicionada a cimentos resinosos na concentração de 2,0 a 5,0%, a quitosana apresentou efeito antibacteriano, inibindo a colonização de *Streptococcus mutans* (Rajabnia et al., 2016). A utilização de quitosana em dentina desmineralizada também tem mostrado resultados favoráveis, como promover remineralização através da formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície (Xu et al., 2011; Del Carpio-Perochena et al., 2015), obtendo bons resultados quando utilizada como material para capeamento pulpar indireto (Chen et al., 2015).

Diante dos resultados obtidos e considerando os benefícios da utilização da quitosana sobre a dentina relatados na literatura, pode-se concluir que a reumificação da dentina com quitosana a 2,5% proporcionou melhores condições para realização de restaurações adesivas, resultando em maior força de adesão.

Conclusão

CONCLUSÃO:

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- 1) O substrato desmineralizado apresentou menor resistência adesiva, quando comparado ao substrato hígido e a reumidificação da dentina com quitosana a 2,5% proporcionou maior resistência de união da interface adesiva;
- 2) A reumidificação da dentina desmineralizada com ácido acético a 1,0% e quitosana a 2,5% gerou alterações na composição química da dentina, apresentando maiores concentrações de cálcio e fósforo;
- 3) A análise de MEV encontrou que a reumidificação da dentina com quitosana não gerou alterações morfológicas na interface adesiva.

*Referências
Bibliográficas*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abraham D, Thomas AM, Chopra S, Koshy SA. Comparative evaluation of microleakage of glass ionomer cement and chitosan-modified glass ionomer cement: An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2014; 7: 6-10.

Arnaud TMS, Neto BB, Diniz FB. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. *J Dent* 2010;38:848-52.

Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, Pashley DH. *In vivo* chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent* 2009;34:379–383.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mat* 2008;24:90–101.

Chen Z, Cao S, Wang H, Li Y, Kishen A, Deng X, Yang X, Wang Y, Cong C, Wang H, Zhang. Biomimetic Remineralization of Demineralized Dentine Using Scaffold of CMC/ACP nanocomplexes in an in vitro tooth model of deep caries. *PLoS One* 2015;10:e0116553.

Cho YW, Cho YN, Chung SH, Yoo G, Ko SW. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. *Biomaterials* 2007; 20:2139-45.

Christensen GJ. The advantages of minimally invasive dentistry. *J Am Dent Assoc* 2005;136:1563–5.

Chung JH, Kim YK, Kim KH, Kwon TY, Vaezmomeni SZ, Samiei M, Aghazadeh M, Davaran S, Mahkam M, Asadi G and Akbarzadeh A. Synthesis, characterization,

biocompatibility of hydroxyapatite-natural polymers nanocomposites for dentistry applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2014;44:277-84.

Daood U, Iqbal K, Nitisusanta LI, Fawzy AS. Effect of chitosan/riboflavin modification on resin/dentin interface: Spectroscopic and microscopic investigations. *J Biomed Mater Res A* 2013;101:1846-56.

del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MAH, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod* 2015;40:195-201.

Diolosà M, Donati I, Turco G, Cadenaro M, Di Lenarda R, Breschi L, Paoletti S. Use of methacrylate-modified chitosan to increase the durability of dentine bonding systems. *Biomacromol* 2014; 15: 4606-13.

Elsaka S, Elnaghy A. Effect of addition of chitosan to self-etching primer: antibacterial activity and push-out bond strength to radicular dentin. *J Biomed Res* 2012;26:288-94.

Erickson RL. Surface interactions of dentin adhesive materials. *Oper Dent* 1992; 5:81– 94.

Farge P, Alderete L, Ramos SM. Dentin wetting by three adhesive systems: influence of etching time, temperature and relative humidity. *J Dent* 2010;38:698–706.

Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Beng LT, Neo J. Chitosan/Riboflavin modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013;17:278-89.

Gades MD, Stern JS. Chitosan supplementation and fat absorption in men and women. *J Am Diet Assoc.* 2005;105:72-7.

- Gwinnett, A.J. Quantitative contribution of resin infiltration/hybridization to dentin bonding. *American Journal of Dentistry* 1993;6: 7–9.
- Hara AT, Turssi CP, Ando M, Gonzáles-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues AL Jr, Serra MC, Cury JA. Influence of fluoride-releasing restorative material on root dentine secondary caries in situ. *Caries Res* 2006;40:435-9.
- Hashimoto M, De Munck J, Ito S, et al. In vitro effect of nanoleakage expression on resin/dentin bond strengths analyzed by microtensile bond test, SEM/EDX and TEM. *Biomaterials* 2004;25:5565–74.
- Hashimoto M, Ohno H, Endo K, Kaga M, Sano H, Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralized dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater* 2000;16:406–411.
- Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741–6.
- Kidd EAM. How 'clean' must a cavity be before restoration? *Caries Res* 2004;38:305-13.
- Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentine: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14: 13-29.
- Kishen A, Shrestha S, Shrestha A, Cheng C, Goh C. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dent Mat* 2016;32:968-77.
- Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 45: 679-728.

Maia RCC, Franco LO, Stamford TCM, Fukushima K, Porto ALF, Campos-Takaki GM. Chitin produced by *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) and applied to wound healing. *J Asian Chitin* 2006;2:11-20.

Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, Mendes FM. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009;54:1111-7.

Marshall GW, Chang YJ, Gansky SA, Marshall SJ. Demineralization of caries-affected transparent dentin by citric acid: an anatomic force microscopy study. *Dent Mater* 2001;17:45-52.

Massara MI, Alves JB, Brandao PR. A traumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. *Caries Res*. 2002;36:430-6.

Murugan R, Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomater* 2004;25:3829-35.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho R, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83:216–21.

Perchyonok VT, Zhang S, Grobler SR, Oberholzer TG. Insights into and relative effect of chitosan-H, chitosan-H-propolis, chitosan-H-propolis-nystatin and chitosan-H-nystatin on dentine bond strength. *Europ J Dent* 2013; 7: 412-8.

Persadmehr A, Torneck CD, Cvitkovitch DG, Pinto V, Talior I, Kazembe M, Kishen A. Bioactive chitosan nanoparticles and photodynamic therapy inhibit collagen degradation in vitro. *JOE* 2014;40:703-9.

- Peumans M, De Munck J, Mine A, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions. A systematic review. *Dent Mater* 2014;30:1089–103.
- Profeta AC, Mannocci F, Foxton RM, Thompson I, Watson TF and Sauro S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin–dentine interface: a microtensile bond strength, scanning electron and confocal microscopy study. *Eur J Oral Sci* 2012;120:353– 62.
- Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microbial Biotechnol* 2009;2:186–201.
- Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G and Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromol* 2003;4:1457-65.
- Rajabnia R, Ghasempour M, Gharekhani S, Gholamhoseinnia S, Soroorhomayoon S. Anti-Streptococcus mutans property of a chitosan: Containing resin sealant. *J Int Soc Prev Community Dent* 2016;6: 49-53.
- Ricci HA, Scheffel DLS, de Souza Costa CA, dos Santos FJ, Jafelicci Jr M, Hebling J. Wettability of chlorhexidine treated non-carious and caries-affected dentine. *Aust Dent J* 2014;59:37-42.
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006;31:603–32.
- Sacramento PA, de Castilho AR, Banzi EC, Puppi-Rontani RM. Influence of cavity disinfectant and adhesive systems on the bonding procedure in demineralized dentin - A one-year in vitro evaluation. *J Adhes Dent* 2012;14: 575-83.

Seeman R, Flury S, Pfefferkorn F, Lussi A, Noack MJ. Restorative dentistry and restorative materials over the next 20 years: A Delphi survey. *Dent Mat* 2014;30:442-8.

Sezer AD, Cevher E, Hatipoglu F, Ogurtan Z, Bas AL, Akbuga J. Preparation of fucoidan–chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits. *Biol Pharm Bull* 2008;31:2333–62.

Shrestha A, Friedman S, Kishen A. Photodynamically crosslinked and chitosan-incorporated dentin collagen. *J dent Res* 2011;90:1346-51.

Thompson V, Craig RG, Curro FA, Green WS, Ship JA. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: a critical review. *J Am Dent Assoc* 2008;139:705.

Toledano M, Osorio R, Moreira MA, et al. Effect of the hydration status of the smear layer on the wettability and bond strength of a self-etching primer to dentin. *Am J Dent* 2004;17:310–4.

Uruuahy MSL. Molhabilidade da dentina erodida tratada com quitosana e análise morfológica da superfície. 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Van der Veen MH, ten Bosch JJ. The influence of mineral loss on the auto-fluorescent behaviour of in vitro demineralized dentine. *Caries Res* 1996;30:93-9.

Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise M, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative SEM and TEM examination of ultrastructure of resin–dentin interdiffusion zone. *J Dent Res* 1993;72:495–501.

Xu Z, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2011;98:150-9.