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

MIRIAN SAAVEDRA LOPES URURAHY

**MOLHABILIDADE DA DENTINA ERODIDA TRATADA COM
QUITOSANA E ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE**

**Ribeirão Preto
2015**

MIRIAN SAAVEDRA LOPES URURAHY

**MOLHABILIDADE DA DENTINA ERODIDA TRATADA COM
QUITOSANA E ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE**

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

Programa: Odontologia Restauradora

Área de concentração: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona

Ribeirão Preto

2015

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.

Assinatura do autor: _____ Data: ____/____/2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Ururahy Mirian Saavedra Lopes

Molhabilidade da dentina erodida tratada com quitosana e análise morfológica da superfície. Ribeirão Preto, 2015.

84p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP). Área de concentração: Odontologia Restauradora- Dentística.

Orientadora: Corona, Silmara Aparecida Milori.

1. Dentina erodida. 2. Molhabilidade. 3. Quitosana 4. Ângulo de contato

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aprovado em: ____/____/____

URURAHY, M. S. L. **Molhabilidade da dentina erodida com quitosana e análise morfológica da superfície.** 2015, (p. Dissertação (Mestrado) -Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

MIRIAN SAAVEDRA LOPES URURAHY

Nascimento 8 de Março de 1968. Rio de Janeiro-RJ.

Filiação Angel Saavedra Guzmán
Helenita Lopes de Saavedra

1989-1995 Curso de Graduação.
Universidade de Ribeirão Preto.

1997-1997 Curso de aperfeiçoamento em Reabilitação Oral
Associação Odontológica de Ribeirão Preto.

2014-2015 Curso de pós-graduação (Mestrado) em Odontologia.
Área de concentração: Odontologia Restauradora
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Pesquisa em Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio de pesquisa da CAPES.

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO

Deus, por ter me permitido concluir este trabalho.

Aos meus pais, **Angel Saavedra Guzmã** (*in memoriam*) e **Helenita Lopes de Saavedra** (*in memoriam*), pelo exemplo de dedicação e amor durante todo o tempo que estiveram presencialmente ao meu lado nessa vida; e pela confirmação diária, ainda que já em outro plano existencial, de que o amor verdadeiro é imortal...e que podemos senti-lo em cada inspiração...em cada momento difícil atravessado...Tenho certeza de que nunca estive só na execução desse trabalho, assim como em toda minha vida. Obrigado por caminharem ao meu lado...posso senti-los como grandes orientadores espirituais em minha vida!!!

Ao meu filho, **Pedro Ney**, por me mostrar todos os dias o quanto vale a pena viver, apesar dos obstáculos! Pelo seu amor infinito...por sua paciência...pela sua alegria de viver; meu grande combustível da vida, e por esse seu sorriso que durante vários dias me reergueu e me conduziu até o final desse trabalho!!! Por você...com você...e pra você sempre meu grande amor!!!!

A minha Avô, **Marieta Martins Lopes de Andrade** (*in memoriam*) pelos mais verdadeiros e nobres ensinamentos que tive, ao longo de sua existência!! Referência incontestável em minha vida!

À minha amada irmã, **Milena Saavedra Lopes do Amaral**, pela amizade, companheirismo e amor. "Baixinha arretada, como toda boa baiana, personalidade forte, cara brava...mas tudo isso é uma máscara.; da sua verdade poucos sabem de sua mansuetude emocional, simplesmente AMOR cheio de vontade de amar, assim é você que eu tanto amo e aprendi a respeitar!!!! Como eu costumo dizer, ela é minha segunda mãe. Obrigada pelas palavras nobres e doces todas as vezes em que eu pensava em fraquejar....cada estímulo seu... cada eu te amo colocado no momento exato... cada

chamativa necessária... foram num conjunto muito particular, elementos propulsores na minha caminhada...Meu grande exemplo de força.. Como um diamante bruto, assim é o seu amor, que diferente do diamante, não precisa ser lapidado, apenas compreendido ;e eu compreendi a força do seu amor!!! Sem o seu acolhimento com certeza eu não teria chegado até aqui!!!!

À minha orientadora, **Professora Dra. Silmara Aparecida Milori Corona**. Acima de tudo pela grata oportunidade de conviver e aprender ao seu lado. Pela sua solicitude e solidariedade perante minhas dificuldades. Fez-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, mas vidas humanas... Você não foi somente orientadora, mas em alguns momentos, conselheira, confidente, mãe e amiga. Você foi e sempre será referência profissional e pessoal para o meu crescimento!!Você acreditou em mim...e o resultado está aqui!!!!!!

Ao meu irmão, **Miguel Angel Saavedra Lopes**, presença forte e constante em minha vida ditou sempre sobre valores morais de uma nobreza que poucos são capazes de vivenciar... e eu sou e serei eternamente grata por poder compartilhar da sua essência de vida!! Ser humano impecável em todos os sentidos!.. Como diz nossa irmã, você já nasceu nobre!!!! Você é sem dúvida minha grande referência de vida!!!

Ao meu irmão, **Marcus Vinicius Saavedra Lopes**, pelo amor colocado em cada abraço silencioso, pela força em cada telefonema...sua verdade sempre me deu a certeza de que distância é realmente um espaço físico...porque mesmo de longe sempre me fez sentir o quanto você estava perto de mim!!!

A minha prima-irmã, **Daniella Lopes Rodrigues**, pelo maior exemplo de amor à vida que já conheci!!! Sua garra....sua alegria....seu entusiasmo....e forma com que sempre vibrou positivamente em minha vida...fazem de você uma prima-especial!! Suas palavras de credibilidade nunca deixaram que morresse em mim a crença pelo belo... pelo grande... pelo fantástico!!! Você é minha grande referência de brinde à vida!!!!!!

Agradecimentos Especiais

Aos meus familiares, pelo amor e união. Por vocês, todas as dificuldades são vencidas e as alegrias compartilhadas. Aos amigos em destaque em minha vida, cada um com sua particular contribuição!!!

Aos meus sobrinhos, **André Luis Saavedra do Amaral, Rafael Lopes de Oliveira, Ana Luiza Ribeiro Saavedra Lopes, Ana Carolina Ribeiro Saavedra Lopes e Vinícius Ribeiro Saavedra Lopes**, por enriquecerem minha vida com esse amor único. Relíquias da minha vida!!!

À minha tia, **Hedylamar Lopes de Andrade**, porque sempre estive na torcida em minha vida de forma tão carinhosa, e verdadeira que mesmo de longe me fazia sentir abraçada e amada!!!

Ao meu tio, **Eisenhower Lopes de Andrade**, pelo grande exemplo de força e coragem...estar ao seu lado fortalece em mim a certeza de que nunca é tarde pra acreditar!!!!

Às melhores Amigas que a vida pode me dar:

Rita de Cássia dos Santos minha irmã espiritual....como agradecer tanto amor e tanto cuidado??? Simplesmente desejando que Deus eternize nossos laços... Obrigada por sua presença de luz em minha vida!!! Amo muito você!!!

Daniela C. Seabra pela presença constante em minha vida, me acolhendo e auxiliando na grande tarefa de ressignificar minha vida ...permitindo que minha caminhada seja sempre mais leve...Minha gratidão e meu eterno amor por você!!!!

Aos amigos **Isabella Rodrigues Ziotti, Rafaela Bragança, Reinaldo Dias da Silva Neto, Isabela Lima de Mendonça, Odine do Rego Bechara, Mario Torigoe, Fabiana curylofo, Mariana Alencar Nemézio**, pela família formada durante o mestrado. Obrigado a cada um de vocês pela sempre paciência em me auxiliar, pelo carinho e companheirismo!!!

Ao meu cunhado **Leonardo Lira do Amaral**, pela prontidão em sempre me auxiliar engrandecendo e direcionando meu trabalho com seus mais nobres conhecimentos da área, tendo sido de extrema importância durante minha qualificação!! Obrigado por tudo!!

Às minhas cunhadas **Michele Ribeiro Contim e Adriane Ribeiro Saavedra Lopes**, pelo carinho e torcida em minha caminhada!!!

Ao **Professor Doutor Rodrigo Galo**, pela amizade, paciência, disponibilidade, auxílio e orientação na análise estatística.

Ao **Professor Doutor César Bataglion**, pela amizade desde a época da graduação, pela disponibilidade em orientação sempre que precisei, e por ter engrandecido minha banca examinadora em minha qualificação..

À minha amiga e psicóloga **Josiane Perussi**, pela grata oportunidade de conviver com tão nobres conhecimentos, que de maneira especial e única fez diferença em minha vida!! Não só seu profissionalismo mas sua luz pessoal são sem dúvida um divisor de águas em minha vida!! "Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota." (Maria Teresa de Cálcutá).

À minha amiga **Maria Lucia Batone Soares**, pela prova viva de que anjos existem sim...e que Deus em sua infinita misericórdia nos outorga a benção de conviver com algum de seus enviados, como prova do seu amor e do nosso merecimento!!! Como sei que o acaso não existe, tenho certeza que nosso encontro antecede a essa existência!! Humana e falível como todos os que aqui vivem, você se fez diferente pra mim pela forma amorosa com que sempre me acolheu mas principalmente por seu caráter humanitário...me sinto privilegiada de poder de alguma forma conviver com você! Obrigada por sempre acreditar e torcer por mim...seu incentivo, por várias vezes me sustentou pela mão!!!

À minha amiga **Flávia Cássia Cabral Rodrigues**, pela grata oportunidade de conviver com tão profunda sutileza....sua luz é vida que abraça minha amiga!!!!

À minha amiga **Juliana Maira Quiroz Garcia**, pela verdadeira e especial preocupação que sempre teve comigo...pelo carinho e incentivo...reencontrar você foi um grande presente de DEUS!!!!

À minha amiga **Giselle Moraes Lourenço**, sempre soube do nosso reencontro...só não sabia que seria de forma tão abençoada com a presença de nossos filhos, agora em nosso convívio. A certeza de que verdades nunca morrem e sempre retornam em nossas vidas...é um bálsamo curador e libertador...muito feliz por voltar a conviver com você!!!!

Aos meus tios **Ieda da Cruz Saavedra** e **Henrique Saavedra Guzmã**n, pelo carinho que me acolheram em um dos momentos mais difíceis da minha vida.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor, **Professor Doutor Valdemar Mallet da Rocha Barros** e a Vice-Diretora **Professora Doutora Léa Assed Bezerra da Silva**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual **Professor Doutor Arthur Belém Novaes Júnior**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, área de concentração em Odontologia Restauradora, na pessoa do atual Professor Doutor **Manuel Damião de Sousa Neto** do Vice-Coordenador, Professor Doutor **Marcelo Oliveira Mazzetto**.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

À **Professora Doutora Regina Guenka Palma-Dibb** por sua prontidão em querer colaborar sempre...pela atenção...e por permitir compartilhar de seus valiosos conhecimentos!!!

À amiga **Juliana Faraoni** por se mostrar sempre pronta a auxiliar em todos os momentos que solicitei...pela simpatia e alegria constante!!

Ao coordenador do curso de farmácia UNIP-Ribeirão Preto-SP, **Prof.Dr Wilson Roberto Malfará**, pela sua sempre disponibilidade em me atender e auxiliar com seu grande conhecimento.!!

À **Professora Doutora Ana Paula Ramos**, docente do departamento de química da faculdade de ciências e letras da Universidade de São Paulo, por disponibilizar o uso do Laboratório de físico-química de superfícies e colóides do departamento de química.

Ao amigo **Lucas Bahia Nogueira**, do departamento de química da faculdade de ciências e letras da Universidade de São Paulo, por sua incrível paciência em me auxiliar nos meus testes de molhabilidade.

À amiga **Rosemary Alves de Sá** pela paciência e carinho em que me auxiliou na formação deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, em especial ao secretário **Carlos Feitosa dos Santos**, sempre prestativo, bem-humorado e disposto a prestar seu auxílio, ao técnicos de laboratório **Reginaldo Santana**, pela amizade e colaboração para execução deste trabalho, e às funcionárias **Luiza Pitol** e **Rosângela Agelini**, pelo convívio diário, atenção e solicitude.

À **Patrícia Marchi**, técnica do Departamento Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pela colaboração e pela disposição na execução da parte experimental deste trabalho.

Aos docentes do departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, FORP-USP em especial ao **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto**, **Prof.ª. Dra. Regina Guenka Palma Dibb**, **Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho**, **Prof.ª. Dra. Aline Evangelista de Souza Gabriel**, **Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora**, **Prof. Dr. Ricardo Novak Savioli**, **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**, **Prof. Dr. Marcelo Oliveira Mazetto**, **Prof. Dr. Luiz Paçoal Vansan** pelos ensinamentos, lições e contribuição para a minha formação.

Aos alunos do Curso de Pós-graduação, **Ana Bárbara Loyola**, **Rodrigo Valério**, pela amizade, companhia diária e garantia de muitos sorrisos.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Resumo

Ururahy, M.S.L. **Molhabilidade da dentina erodida com quitosana e análise morfológica da superfície**. Ribeirão Preto, 2015. 84p. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2015.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da quitosana nas concentrações de 2,5% e 5,0% na molhabilidade da dentina erodida. 104 espécimes de dentina bovina (7,0x7,0x2,5) foram planificados e polidos, e para o desafio erosivo os espécimes foram imersos em 20mL de ácido cítrico (pH=3.2) sob agitação durante 2h. Os espécimes foram divididos aleatoriamente de acordo com o substrato dentinário: hígido e erodido e subdivididos em 4 grupos (n=10): sem reumidificação (controle), ácido acético a 1%, quitosana a 2,5% e quitosana a 5,0%. Em seguida, uma gota do sistema adesivo Single Bond 2 (3M) foi depositada sobre a superfície de cada espécime. Os ângulos de contato entre a superfície de dentina e o adesivo foram mensurados por meio de um goniômetro. Os outros 24 espécimes foram submetidos à análise da superfície por meio MEV. Os testes estatísticos utilizados foram o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e análise de variância (ANOVA) ($p>0,05$). Não foram encontradas diferenças entre os ângulos de contato produzidos na dentina erodida reumidificada com quitosana nas concentrações de 2,5% e 5,0%. A solução de quitosana, independente de sua concentração, não influenciou na molhabilidade da dentina erodida. Através de análise em MEV, verificou-se que houve deposição de partículas de quitosana sobre a superfície e no interior dos túbulos dentinários.

Palavras-chave: Dentina erodida, Quitosana, Molhabilidade, Ângulo de contato.

Abstract

URURAHY, M.S.L. **Wettability of Chitosan Treated Eroded Dentin and Analysis of Surface Morphology**. Ribeirão Preto, 2015. 84p. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2015.

ABSTRACT

The aim of this study to assess the effect of chitosan, in concentrations of 2.5% and 5.0%, on the eroded dentin wettability, followed by analysis of surface morphology by SEM. 104 bovine dentin slabs were ground, polished and then immersed in 20mL of citric acid (pH = 3.2) under continuous stirring for 2h. Specimens were randomly divided according to the dentin substrate: sound and eroded, and then, subdivided into 4 groups (n=10): without rewetting (control), 1% acetic acid, 2.5% chitosan and 5.0% chitosan. Then, a drop of the adhesive system Single Bond 2 (3M) was deposited onto surface of each specimen. The contact angle between dentin surface and the adhesive system was measured by using a goniometer. The other 24 specimens were subjected to analysis under SEM. Statistical analysis was performed using the normality test (Kolmogorov-Smirnov) and Analysis of Variance (ANOVA) ($p > 0.05$). No differences were found between the angles produced on the eroded dentin re-rewetting with chitosan in the concentrations of 2.5% and 5%. The chitosan solution, regardless of the concentration used, did not influence of the eroded dentin wettability. Through SEM analysis, it was found particles of chitosan deposited on the surface and within the dentinal tubules.

Key-words: eroded dentin, chitosan, wettability, contact angle

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	41
2. PROPOSIÇÃO.....	49
3. MATERIAL E MÉTODO.....	53
Delineamento experimental.....	55
Seleção dos dentes.....	56
Preparo da amostra.....	56
Formação das lesões de erosão.....	57
Tratamento da superfície de dentina.....	59
Análise da molhabilidade superficial da dentina erodida	59
Análise Estatística.....	60
Preparo dos espécimes para Microscopia Eletrônica de Varredura.....	61
4. RESULTADOS.....	63
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	77

Introdução

INTRODUÇÃO

A erosão dental ocorre devido ao contato prolongado dos tecidos dentais com substâncias ácidas provenientes de fontes intrínsecas ou extrínsecas (Imfeld, 1996; Lussi&Hellwig, 2006), sem o envolvimento de bactérias (Grippio et al 2004). Clinicamente, este processo caracteriza-se pela perda progressiva e irreversível de estrutura dental levando a desmineralização (Addy&Shellis et al., 2006) dos tecidos, que dependendo do grau de severidade das lesões, pode resultar em hipersensibilidade dental (Barbour et al. 2011), com conseguinte redução de sua microdureza superficial (Lussi et al 2006) por aumento de sua permeabilidade (Prati et al., 2003) com a remoção de *smea rplug* e dissolução da dentina peritubular, o que pode desencadear sintomatologia dolorosa (Prati et al., 2003), bem como, danos funcionais e estéticos.

Os tecidos dentais apresentam composições distintas, o que faz com que os agentes erosivos tenham diferentes efeitos sobre o esmalte e a dentina (Shelliset al., 2010). O esmalte é composto por mineral (85% em volume), na forma de cristais de hidroxiapatita ou fluorapatita, organizados em prismas, e a dentina possui componente inorgânico (47% de apatita), orgânico (33% de colágeno) e água (20%) (Magalhães et al., 2009). Inicialmente, o processo erosivo ocorre de maneira semelhante no esmalte e na dentina, até o momento no qual as fibras colágenas tornam-se expostas, com posterior redução da erosão no tecido dentinário. As fibras colágenas atuam como uma barreira mecânica à perda mineral, além de possuírem capacidade tampão (Kleter et al., 1994; Hara et al., 2005).

A erosão no substrato dentinário é caracterizada por diferenças na resistência ácida, quando se compara a dentina peritubular com a intertubular. A dentina peritubular é totalmente dissolvida o que causa aumento do diâmetro dos

túbulos dentinários (Meurman et al., 1991; ten Cate, 1996; Ganss et al., 2009) e conseqüentemente, a permeabilidade (Prati et al., 2003), enquanto a dentina intertubular apresenta maior rugosidade e porosidade (Meurman et al., 1991; ten Cate, 1996). Alguns estudos (Ganss et al., 2004; Ganss et al., 2007; Ganss et al., 2009; Barbour et al., 2011; Lussi et al., 2011) sugerem que a erosão da dentina vai reduzindo na medida em que a quantidade de colágeno desmineralizado aumenta. Pressupõe-se que essa matriz orgânica exposta age como uma membrana protetora com capacidade tampão suficiente para reduzir a desmineralização e retardar a perda de minerais e a difusão de íons H^+ para regiões mais profundas da dentina. Estas características histológicas indicam que o conteúdo orgânico da dentina pode exercer um papel importante na progressão da erosão, uma vez que após a ação do ácido, ocorre uma perda de volume na dentina mais lenta, quando comparada com a porção inorgânica da estrutura dental.

Além da dissolução mineral, a degradação enzimática do colágeno (Ganss et al 2004; Schlueter et al 2010) pode interferir na qualidade da rede de colágeno (Sabatini et al., 2014) o que reflete diretamente no sucesso das restaurações com compósito, que são preferíveis por se basearem em abordagens minimamente invasivas (Atin & Wegehaupt, 2014), além de não serem solúveis em ácido (Milosevic, 1996). A dentina apresenta as MMPs, que são uma classe de collagenases zinco e cálcio-dependentes que tem como função regular o metabolismo dos tecidos que contém colágeno (Chaussain-Miller et al., 2006) e que, conseqüentemente são capazes de degradar a matriz orgânica de dentina após a desmineralização (Pashley et al., 2004) seja ela causada por processo carioso ou por ação de ácidos envolvidos no processo restaurador, sendo que sua ação sobre fibrilas de colágeno expostas na união resina-dentina é atualmente reconhecida

como um importante mecanismo de degradação dessas interfaces (Brackett et al.,2007;Hebling et al.,2005).

A utilização de biopolímeros,como a quitosana,para aumentar o número de ligações cruzadas entre as fibras de colágeno e neutralizar as metaloproteinases da matrix (MMPs),pela capacidade de reforçar (Profeta et al.,2012;Fawzy et al.,2013) e estabilizar (Bredan-Russo et al.,2007;Sherestha et al.,2011) o colágeno da dentina, uma vez que esse biopolímero é capaz de produzir em matrizes protéicas,como as das fibras colágenas, arranjos microfibrilares (Majeti& Kumar,2000) com propriedades mecânicas superiores (Dash et al.,2011) melhorando a assim qualidade e longevidade das restaurações adesivas.

O uso de inibidores de MMPs, portanto, tem sido aceito com estratégia eficaz para melhorar a longevidade das restaurações adesivas (Carrilho et al.,2007; Loguércio et al., 2009; ;Breschi et al., 2010; Osório et al.,2011) e como possível mecanismo que conduz a uma redução da perda de dentina durante desafios erosivos (Magalhães et al.,2009; Buzalaf et al.,2012).

A quitosana é um biopolímero com uma estrutura química única formando um polícatión linear, com elevada densidade de carga e de grupos reativos assim como inúmeras ligações de hidrogênio (Kumaret al.,2000). É primariamente produzida da quitina que existe abundantemente na natureza como componente estrutural do exoesqueleto de artrópodes (incluindo crustáceos e insetos), diatomáceas, algas e paredes celulares de alguns fungos. Estruturalmente a quitina é um mucopolissacarídeo linear e insolúvel em água, estrutura essa muito semelhante à da celulose onde o grupo hidroxila (-OH) da posição C2 é substituído pela acetamida (-NHCOCH₃) (Kumar et al.,2000). A extração da quitina envolve a remoção ácida do carbonato de cálcio (desmineralização) e a desproteinização em

solução básica quente (normalmente hidróxido de Na ou K (Kumar, 2000). A quitina é pouco solúvel e pouco reativa. A sua estrutura pode ser modificada por remoção dos grupos acetila que se encontram ligados a radicais amina na posição C2 do anel de glucano por hidrólise química produzindo um derivado desacetilado. Quando a fração de grupos amina acetilados é reduzida para 35-40%, co-polímero resultante é denominado de quitosana; que é então caracterizada pelo seu peso molecular (MW) e grau de acetilação (DA). A quitosana é uma base fraca insolúvel em água; sendo que a sua solubilidade depende da sua origem biológica, peso molecular e grau de acetilação e isso afeta diretamente as suas aplicações. A quitosana apresenta propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesão e atoxicidade no corpo humano (AKncbay H et al 2007).

Sabe-se que a eficiência de um agente quelante depende de vários fatores (tempo de aplicação, pH, concentração da solução e quantidade da solução). A relação entre a concentração do agente quelante (Calt,2002;Hulsmann et al., 2003) e o tempo de aplicação parece ser importante uma vez que as soluções de elevadas concentrações aplicadas durante um longo período de tempo promovem rugosidade na superfície da dentina.

A solubilidade da quitosana depende da distribuição dos grupos amino livres e N-acetila. Ela é normalmente insolúvel em meios neutros e básicos, enquanto que pode ser dissolvida em meios ácidos diluídos. Em tais condições os grupos amino livres são protonados e a molécula se torna solúvel. Quanto maior a quantidade desses grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e também maior a solvatação em água (Santos et al.,2003).

Diante da possibilidade de reumidificar a superfície da dentina erodida com solução de quitosana, torna-se importante mensurar os ângulos de contato e a

influência desta solução na molhabilidade da dentina erodida. A molhabilidade é fortemente dependente da rugosidade, composição química e estado de hidratação e pode ser influenciada pela densidade numérica dos túbulos dentinários. Tanto a molhabilidade como a profundidade de infiltração adesiva possui um importante papel na qualidade e na durabilidade da interface resina-dentina.

Proposição

PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da quitosana nas concentrações de 2,5% e 5,0% na molhabilidade da dentina erodida por meio de medidas de ângulo de contato e análise morfológica da superfície da dentina por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Material e Método

MATERIAL E MÉTODO

Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram *substrato dentinário*, (hígido e erodido) e a *reumidificação da superfície* (ácido acético a 1%, quitosana a 2,5% e quitosana a 5,0%) Os espécimes do grupo controle não receberam a reumidificação com quitosana. A amostra do experimento foi composta por 104 incisivos bovinos divididos aleatoriamente em 8 grupos. O delineamento foi realizado em blocos completos casualizados. A variável de resposta quantitativa foi mensuração do ângulo de contato (n=10) formado entre a dentina e o sistema adesivo e a variável qualitativa foi realizada através da análise da morfologia da superfície (n=3) por meio de microscopia eletrônica de varredura . O desenho experimental do estudo está representado pela (Figura 1).

Figura 1. Delineamento experimental do estudo.

Seleção dos dentes

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

Preparo da amostra

Os dentes foram seccionados transversalmente na junção amelocementária para separar as coroas das raízes, utilizando disco diamantado (série 15HC 11-4244, Buehler, Illinois, EUA) montado em máquina de corte (Isomet 1000; Buehler, Alemanha). Posteriormente, as coroas dentais foram seccionadas no sentido mésiodistal a fim de obter duas hemi-seções (vestibular e palatina) de cada coroa. A partir da hemi-seção vestibular foi obtido 1 fragmento de 7 x 7 x 2,5mm de dentina.

Os fragmentos foram fixados em matrizes de teflon utilizando-se cera fundida (Kota Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil) com a superfície do esmalte voltada para baixo. Em seguida, as superfícies de dentina foram polidas em politriz Arotec APL-4 (Arotec S/A Ind. Com, SP, Brasil) refrigerada à água com lixas d'água com granulação de #180 a #320 com a finalidade de remover excessos laterais e acertar o tamanho dos fragmentos, em seguida, para o polimento das superfícies de dentina foi realizado com lixa de granulação #1200 (Hermes Abrasives Ltda., VA, EUA) por 10 segundos, a fim de planificar a superfície de dentina de cada espécime. Por fim, os espécimes foram polidos com pasta de alumina 0.3- μ m (Arotec S/A Ind. Com., SP, Brasil) em feltro polidor (ATM, Altenkirchen, Alemanha) por 5 segundos.

Formação das lesões de erosão

Para induzir a formação das lesões de erosão, foi utilizado protocolo estabelecido por Vanuspong et al., 2002. Cada espécime de dentina foi imerso em 20 mL de ácido cítrico 0.3% (pH=3.2) individualmente e colocados na mesa agitadora (CIENTEC-CT155) na qual permaneceram sob agitação constante, numa velocidade de 50rpm, por um período de 2 horas. Após esse período, os espécimes foram lavados com água destilada e armazenados individualmente em ependdorffs contendo saliva artificial por 24 horas em estufa a 37°C. A saliva artificial foi composta por metilparabeno (2,0 g), carboximetilcelulose de sódio (10,0 g), KCl (0,625 g), MgCl 2.6H₂O (0,059 g), CaCl₂.2H₂O (0,166 g), K₂HPO₄ (0,804 g), e KH₂PO₄ (0,326 g) em 1000 mL de água destilada, conforme protocolo descrito por McKnight-Hanes e Whitford e modificada por Amaechi et al. 1999.

Figura 2. Representação esquemática da metodologia empregada.

Tratamento da superfície de dentina

O ácido fosfórico a 35% (Ultra-EtchUltradent, São Paulo, Brasil) foi aplicado em todos os espécimes de dentina por 15 segundos, seguido de lavagem abundante com água destilada (10 seg) e secagem com papel absorvente.

Para os espécimes que receberam a reidratação da dentina, este procedimento foi realizado com solução de quitosana a 2,5% e 5,0% (Arnaud et al 2010). Para o preparo da solução de quitosana foram pesadas 2,5 grams de quitosana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) para obtenção da solução de quitosana 2,5% e 5,0 gramas para obtenção da solução de quitosana de 5,0%; de baixo peso molecular (75-85% de desacetilação) (Chunget al., 2014) em balança analítica (Bel Equipamentos Analíticos LTDA, SP, Brasil), a qual foi adicionada lentamente a 100 mL de solução de ácido acético 1%, sob agitação magnética (Marconi Equip. Lab. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) durante 20 min de agitação (tempo suficiente para solubilizar o polissacarídeo), sendo esta filtrada após este período (filtro Millex GV, poro 0,22µm). A fim de evitar a agregação das partículas e elevar o pH da solução, foi adicionado 1 mol/L de solução NaOH (Daoodet al., 2013; Fawzyet al., 2013).

Para aplicação de solução quitosana foi empregada uma seringa de vidro com 0,5ml da solução, a qual permaneceu sobre a superfície durante 1 min (Arnaud et al 2010), seguida por lavagem com seringa tríplice por 5 segundos.

Análise da molhabilidade superficial da dentina erodida

A molhabilidade superficial da dentina foi determinada pela medição do ângulo de contato (θ) pelo método da gota séssil, utilizando-se um goniômetro (Optical Contacte Ângulo Measurements (OCA20 Data Physics Instruments GmbH Wurttemberg, Alemanha). Cada espécime foi posicionado sobre uma plataforma móvel com parafusos de nivelamento. Em seguida, uma gota de aproximadamente

20L do adesivo (Single Bond Universal, 3M Deutschland, Alemanha) foi dispensada sobre o espécime. Por meio de um sistema de iluminação com lâmpada de tungstênio e uma câmera CCD(Dispositivo de Carga Acoplada) , a imagem da gota sobre a superfície dentinária foi captada por um período de 2 minutos, em intervalos de 1 ms. Um microcomputador processou a imagem da gota, e a tangente formada entre a gota e a superfície foi ajustada para determinação dos valores de (θ) com auxílio do software SCA20. Os valores de (θ) foram analisados por meio de um programa específico, como média de (θ) no equilíbrio. Todos os procedimentos envolvendo a mensuração de (θ) foram realizados em ambiente fechado e em temperatura ambiente controlada de 25° (Figura 3).

Figura 2. Esquema representativo da medida do ângulo de contato. gota do adesivo dispensada sobre a superfície de dentina (DE); $\angle$ ângulo de contato formado entre a gota do adesivo e a dentina.

Análise Estatística

Os valores de (θ) foram submetidos ao teste de normalidade, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov com o nível de significância de 5,0%, e os dados apresentaram-se normal e homogêneo. Sendo assim, os dados experimentais foram analisados estatisticamente por ANOVA (paramétrico) para averiguar se a solução de quitosana, independente de sua concentração, poderia influenciar na molhabilidade da dentina erodida. O teste de DUNCAN ($p \leq 0,05$) foi utilizado para múltiplas comparações. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS para Windows, versão 12.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA.

Preparo dos espécimes para Microscopia Eletrônica de Varredura

Os fragmentos (n=3) foram colocados nos frascos de Eppendorff com água destilada e foram preparados de acordo com o seguinte protocolo: limpeza em ultrassom (UltrasonicCleaner T-1449-D, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 10 minutos; secagem com papel absorvente; aplicação de gel de EDTA por 30 segundos; imersão em solução de glutaraldeído a 2,5% tamponado com solução de cacodilato de 9 sódio AA 0,1M com pH 7,4 (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) em temperatura de 4°C por 12 horas; lavagem com água destilada por 3 minutos, seguida de imersão em água destilada por 1 hora, com trocas a cada 20 minutos; desidratação em graus ascendentes de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, SP, Brasil): 25% (20 min), 50% (20 min), 75% (20 min), 95% (30 min), 100% (60 min). Após a desidratação, os espécimes serão imersos em solução de HMDS (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos para secagem química. Todos esses procedimentos foram realizados no interior de uma capela. Depois da secagem, os corpos-de-prova foram fixos em stubs com fita dupla-face de carbono e a cobertura com ouro realizada em aparelho de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, FL9496, Balzers, Liechtenstein).

Os espécimes foram levados ao microscópio eletrônico de (JSM-6610LV, JEOL, Peabody, MA, USA) pertencente ao Laboratório Multi-Usuários da Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Ribeirão Preto. Foi realizada a varredura de toda a superfície do espécime e, em seguida fotografada a área mais representativa de cada grupo em diferentes aumentos. A análise de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada qualitativamente.

Resultados

RESULTADOS

Os valores das médias (desvio padrão) e comparações estatísticas dos ângulos de contato após a reumidificação do substrato dentinário com quitosana, nas diferentes concentrações, estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Médias e desvios padrão do menor ângulo de contato (Θ), apresentado por cada grupo.

REUMIDIFICAÇÃO	SUBSTRATO DENTINÁRIO	
	HÍGIDA	ERODIDA
Sem reumidificação	29,51 $\pm$ 7,70 ^{ab}	30,26 $\pm$ 6,0 ^{ab}
Ácido acético	24,41 $\pm$ 8,45 ^{ab}	32,26 $\pm$ 9,28 ^b
Quitosana a 2,5%	23,34 $\pm$ 4,56 ^a	30,68 $\pm$ 5,67 ^{ab}
Quitosana a 5,0%	26,29 $\pm$ 11,44 ^{ab}	29,22 $\pm$ 8,93 ^{ab}

Letras semelhantes indicam similaridade estatística.

A ANOVA revelou que não houve interação significativa entre reumidificação e a condição do substrato dentinário ($p > 0,05$). A reumidificação com solução de quitosana, independente da concentração, não influenciou no ângulo de contato entre o substrato dentinário e o sistema adesivo ($p > 0,05$). As médias do menor ângulo de contato variaram entre 23,43, para dentina hígida reumidecida com solução de quitosana a 2,5% até 32,26 graus para a dentina erodida reumidecida com ácido acético a 1%.

Figura 3. Fotomicrografias da dentina hídida após os diferentes tratamentos realizados: A) sem reumidificação (controle); B. Ácido acético a 1%; C. Quitosana a 2,5%; D. Quitosana a 5,0%. Setas indicam presença de partículas de quitosana depositadas na abertura dos túbulos (imagens em destaque representam a região em aumento de 5000x).

Figura 4. Fotomicrografias da dentina erodida após os diferentes tratamentos realizados: A) sem reumidificação (controle); B. Ácido acético a 1%; C. Quitosana a 2,5%; D. Quitosana a 5,0%. Setas indicam presença de partículas de quitosana depositadas na abertura dos túbulos (imagens em destaque representam a região em aumento de 5000x).

Na Figura 3, as imagens de microscopia eletrônica de varredura representam as amostras de dentina hígida, nos diferentes grupos. Imagem A mostra a superfície desmineralizada, após condicionamento com ácido fosfórico a 35%. Na imagem B, pode ser visto um padrão de desmineralização semelhante ao observado em A, promovido pela aplicação do ácido acético a 1% (veículo de diluição da quitosana). A aplicação de solução de quitosana a 2,5% e 5,0% proporcionou deposição de partículas de quitosana na superfície e no interior dos túbulos dentinários (Imagens C e D).

Na Figura 4, as imagens de microscopia eletrônica de varredura representam as amostras de dentina erodida, nos diferentes grupos. Imagem A mostra a superfície desmineralizada, após condicionamento ácido com ácido fosfórico a 35%, apresentando remoção da *smear layer*, com túbulos dentinários abertos. Na imagem B, verifica-se uma superfície homogênea, com matriz orgânica desmineralizada, sem *smear layer* e com túbulos dentinários abertos. A dentina peritubular apresentou-se completamente desmineralizada e a dentina intertubular exibiu um aspecto poroso com rugosidade e exposição de fibrilas de colágeno, um padrão de desmineralização semelhante ao da imagem A, porém com aumento de exposição das fibras de colágeno. Na imagem C, verifica-se a presença de partículas de quitosana tanto na superfície quanto no interior dos túbulos dentinários. Na imagem D, houve deposição de quitosana predominantemente no interior dos túbulos dentinários.

Discussão

DISCUSSÃO

O emprego de solução de quitosana na dentina tem apresentado resultados favoráveis em relação remineralização (Del Carpio-Perochena et al., 2015), propiciando a formação de uma camada de fosfato de cálcio sobre a dentina desmineralizada (Xu et al., 2011). Além disso, a utilização de quitosana promoveu o aumento na resistência da superfície da dentina frente à degradação pelas collagenases (Sherestha et al., 2012), tornando a estrutura dentinária mecanicamente mais resistente a desafios de degradação hidrolítica, bem como, por collagenases bacterianas (Fawzy et al., 2013), o que pode favorecer o aumento da durabilidade de restaurações adesivas (Xu et al., 2010).

Considerando estes aspectos favoráveis da aplicação da solução de quitosana na dentina e frente às dificuldades encontradas para obter ótima molhabilidade do sistema adesivo na superfície da dentina erodida, verifica-se a importância de avaliar a medida do ângulo de contato do sistema adesivo à dentina desmineralizada, reumidificada por solução de quitosana a 2,5% e 5,0%, e correlacionar estes achados com a morfologia da superfície da dentina.

Baseado nos resultados deste estudo, a hipótese nula de que a reumidificação do substrato dentinário hígido ou erodido não influencia no ângulo de contato entre a dentina e o sistema adesivo foi aceita. Neste estudo, o condicionamento com ácido fosfórico na dentina erodida (Figura 4A) propiciou uma superfície homogênea, com matriz orgânica desmineralizada, sem *smear layer* e com túbulos dentinários abertos, de uma forma um pouco mais intensa quando comparada a dentina hígida (Figura 3A), que também foi condicionada com ácido fosfórico. No entanto, não houve interação significativa entre reumidificação e a condição do substrato dentinário. A comparação destes resultados com a literatura torna-se difícil, uma vez que, não existem estudos que analisaram o efeito da reumidificação da dentina erodida com solução de quitosana.

A hipótese nula de que a reumidificação com solução de quitosana, independente da concentração, não influencia no ângulo de contato entre o substrato dentinário e o sistema adesivo, foi aceita. O fato de a quitosana não influenciar no ângulo de contato e, conseqüentemente, na molhabilidade, pode assegurar sua utilização como possível

coadjuvante da adesão à dentina erodida, aliado aos seus já comprovados benefícios, como biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de ser atóxica (Rinaudo, 2006; Raafat) e possuir ação quelante (Silva et al., 2012).

Uma das possíveis justificativas para a não influência da quitosana no ângulo de contato da dentina erodida pode estar relacionado ao fato de ter ocorrido uma predominância de deposição de quitosana no interior dos túbulos dentinários o que não influenciou no contato entre o substrato e a gota do adesivo, como ilustra as fotomicrografias apresentadas nas Figuras 3C e 3D.

Outro aspecto que pode ser considerado é a quantidade de grupamentos amina protonados ($-NH_3^+$) na cadeia polimérica da quitosana estar relacionada à solubilidade da molécula. A repulsão eletrostática destes grupamentos ocorre em função de sua maior ou menor quantidade. Assim, o fato de a dentina reumidificada com quitosana 5,0% (Figura 3D e 4D) apresentar predominância de partículas de quitosana no interior dos túbulos pode estar relacionada há uma menor interação eletrostática repulsiva deste grupamento.

Fatores como a tensão superficial do líquido e a energia livre da superfície do sólido, podem influenciar a molhabilidade, pois para alcançar molhabilidade ótima, a energia livre de superfície do sólido tem que ser maximizada, e o líquido deve apresentar baixo ângulo de contato com o sólido (Tsujimoto et al 2010). No entanto, estes fatores parecem não terem exercido influência no ângulo de contato entre a superfície de dentina e o sistema adesivo, uma vez que, a molhabilidade nos diferentes substratos não apresentou diferença.

Tanto a molhabilidade quanto a profundidade de infiltração adesiva possui um importante papel na qualidade e na durabilidade da interface resina-dentina. Os resultados do presente estudo demonstraram que a impregnação na dentina erodida pela quitosana não influenciou a molhabilidade deste substrato, o que pode sugerir 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.

Conclusão

CONCLUSÃO

Conclui-se que a solução de quitosana nas concentrações de 2,5% e 5,0% não influenciou no ângulo de contato da dentina erodida. Através de análise em MEV, verificou-se que houve deposição de partículas de quitosana sobre a superfície e no interior dos túbulos dentinários.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADDY, M.; SHELLIS, R. P. Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 17-31, 2006.
- AMAECHI, B. T.; HIGHAM, S. M.; EDGAR, W. M. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. **J Rehabil Oral**, v. 26, n. 8, p. 624-630, 1999.
- ARNAUD, T. M.; DE BARROS NETO, B.; DINIZ, F. B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. **J Dent**, v. 38, n. 11, p. 848-852, 2010.
- ATTIN, T.; WEGEHAUPT, F. J. Methods for assessment of dental erosion. **MonograSci Oral**, v. 25, p. 123-142, 2014.
- BARBOUR, M. E.; LUSSI, A. S.; SHELLIS, R. P. Screening and prediction of erosive potential. **Caries Res**, v. 45, n. 1, p. 24-32, 2011.
- BEDRAN-RUSSO, A. K.; PEREIRA, P. N.; DUARTE, W. R.; DRUMOND, 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. 268-272 2007.
- CALT, S.; SERPER, A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. **J Endod**, v. 28, n. 1, p. 17-19, 2002.
- CHAUSSAIN-MILLER, C.; FIORETTI, F.; GOLDBERG, H.; MENASHI, S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. **J Dent Res**, v. 85, n. 1, p. 22-32, 2006.
- DAOOD, U.; IQBAL, K.; NITISUSANTA, L. I.; FAWZY, A. S. Effect of chitosan/riboflavin modification on resin-dentin interface: spectroscopic and microscopic investigations. **J Biomed Mater Res A**, v. 101, n. 7, p. 1846-1856, 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. **Rest Dent Endod**, v. 40, n. 3, p. 195-201, 2015.

FAWZY, A. S.; NITISUSANTA, L. I.; IQBAL, K. L.; DAOOD, B.; ENG L.T.; NEO, J. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. **J MechBehav Biomed Mater**, v. 17, p. 278-289, 2013.

GANSS C.; HARDAT. M; BLAZEK, D.; KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Effect of Toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine.**Eur J Oral Sci**, v. 117, n. 3, p. 225-256, 2009.

GANSS, C.; HARDT, M.; BLAZEC, D.; KLEMEK, J.; SCHLUETER, N. Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. **Eur J Oral Sci**, v. 117, n. 3, p. 255-260, 2009.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; BRUNE, V.; SCÜMAN, A. Effect of two Flurodation Measures on Erosion Progression in Human Enamel and Dentine in situ. **Caries Res**,.Caries Res, n. 38, f. :561-566,2004.

GANSS, C.; LUSI, A.; SCHLUETER, N. Insights in etiological factors and photomechanisms, and current strategies for prevention and therapy. **Am J dent**, v. 25, n. 6, p. 351-364, 2012.

GANSS, C.; SCHLUETER, N.; HARDT, M.; VON HINCKELDEY, J.; KLEMEK. J. Effects of toothbrushing on eroded dentin. **Eur J Oral Sci**,v. 115, n. 5, p. 390-396, 2007.

GRIPPO, J. O. Biocorrosion vs. erosion: the 21st century and a time to change. **CompendContinEducDent**, v. 33, n. 2, p. 33-37, 2012.

GRIPPO, J. O.; SIMRING, M.; S. SCHREINER. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. **J Am Dent Assoc**, v.135, n. 8, p. 1109-1118,2004.

HARA, A. T.; ANDO, M.; CURY, J. A.; SERRA, M. C.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; ZERO, D. T. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. **Caries Res**, v. 39, n. 2, p. 134-138, 2005.

HÜLSMANN, M.; HECKENDORFF, M.; LENNON, A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. **IntEndod J**, v. 36, n. 12, p. 810-30, 2003.

IMFELD, T. Dental erosion. Definition, classification and links. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 2, p. 151–155, 1996.

INOUE, N.; TSUJIMOTO, A.; TAKIMOTO, H.; OOTSUKA, E.; ENDO, H.; TAKAMIZAWA, T.; MIYAZAKI, M. Surface free-energy measurements as indicators of the bonding characteristics of single-step self-etching adhesives. **Eur J Oral**, v. 118, n. 5, p. 525-530, 2010.

ISHIHARA, K.; NOMURA, H.; MIHARA, T.; KURITA, K.; IWASAKI, Y.; NAKABAYASHI, N. Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? **J Bimed Mater Res**, v. 39, n. 2, p. 323-30, 1998.

KLETER, G. A.; DAMEN, J. J.; EVERTS, V.; NIEHOF, J.; TEN CATE, J. M. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. **J Dent Res**, v. 75, n. 9, p. 1523-1529, 1994.

KUMAR, R. M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

LOUERCIO, A. D.; STANISLAWK, R.; POLLI, L. G.; COSTA, J. A.; MICHEL, M. D.; REIS, A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin Bond strength durability. **Eur J Oral sci**, v. 117, n. 5, p. 587-596, 2009.

LUSSI, A.; HELLWINGE, E. Risk assessment and preventive measures. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 190-191, 2006.

LUSSI, A.; ZERO, D.; GANSS, C.; REN, Y. Methodology and models in erosion research. **Caries Res**, v. 45, 1:1.2001.

MAGALHÃES, A. C.; WIEGAND, A.; RIOS, D.; HANNAS, A.; ATTIN H; BUZALAF, M. Chlorhexidine and green tea extrat reduce dentin erosion and abrasion in situ. **J Dent**, v. 37, n. 12, p. 994-998, 2009.

MEURMAN, J. H.; DRYSDALE, T.; FRANK, R. M. Experimental erosion of dentin. **Scan J Dent Res**, v. 99, n. 6, p. 457-462, 1991.

MEURMAN, J. H.; TEN CATE, J. M. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 2, p. 199-206, 1996.

MILOSEVIC, A.; JONES, C. Use of resin-bonded ceramic crowns in a bulimic patient with severe tooth erosion. **Quintessence Int**, v.27, n. 2, p. 123-127, 1996.

OSÓRIO, R.; YAMUTI, M.; OSÓRIO, E.; RUIZ-REQUENA, M. E...;PASHLEY, D. F. TAY.;TOLEDANO, M. Effects of dentin etching and chlorexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. **Eur J Oral Sci**,v. 119, n. 1, p. 79-85,2011.

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

PIMENTA, J. A.; ZAPAROLLI, D.; PÉCORA, J. D.; DA CRUZ-FILHO, A. M. Chitosan: effect of a new chelanting agent on the microhardness of root dentin. **BrasDent J**, v. 23, n. 3, p. 212-217, 2002.

PRATI, C.; MONTEBUGNOLI, L.; SUPPA, P.; VALDRÈ, G.; MONGIORGI, R. Permeabilityandmorphologyofdentinaftererosioninducedbyacidic drinks. **J Periodontol**, v. 7, n. 4, p. 428-36, 2003.

RAAFAT, D.; SHAL, H. G. Chitosan and its antimicrobial potential-a critical literature survey. **Microb Biotechnol**, v. 2, n. 2, p. 186-201, 2009.

ROSALLES, J. I.; MARSHALL, G. W.; MARSHALL, S. J.; WATANABE, L. G.; TOLEDANO, M.; CABRERIZO, M. A.; OSÓRIO, R. Acid-etching and Hydration Influence on dentin Roughness and Wettability. **J Dent Res**, v. 78, n. 9, p. 1554-1559, 1999.

SABATINI, C.; PASHLEY, D. H. Mechanisms regulating the degradation of dentine matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. **Am J Dent**, v. 27, n. 4, p. 203-214, 2014.

SCHLUETER, N.; NEUTARD, L.; VONHINCKELDEY, J.; KLEMIK, J.; GANSS, C. Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. **Acta Odontol Scand**, v.68, n. 3, p. 180-184, 2010.

SHELLIS, R. P.; BARBOUR, M. E.; JONES, S. B.; ADDY, M. Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. **Eur J Oral Sci**, v.118, n. 5, p. 475-482, 2010.

SHRESTHA, A.; FRIEDMAN, S.; KISHEN, A. Photodynamically crosslinked and chitosan-incorporated dentin collagen. **J dent Res**, v. 90, n. 11, p. 1346-1351, 2011.

SHERESTHA, A.; KISHEN, A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1257-1258, 2012.

SILVA, P. V.; GUEDES, D. F.; PÉCORA, J. D.; DA CRUZ-FILHO, A. M. Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. **Bras Dent J**, v. 23, n. 4, p. 357-361. 2012.

VANUSPONG, W.; EISENBURGER, M.; ADDY, M. Cervical tooth wear and sensitivity: erosion, softening and rehardening of dentine; effects of pH, time and ultrasonication. **J Clin Periodontol**, v. 29, p. 351-357, 2002.

VENTER, J. P.; KOTZE, A. F.; AUZELY-VELTY, R.; RINAUDO, M. Synthesis and evolution of the moco adhesivity of a CD-chitosan derivative. *Int J Pharm*, v. 313, n. 1-2, p. 36-42, 2006.

XU, C.; LEI, C.; MENG, L.; WANG, C.; SONG, Y. Chitosan as a barrier membrane material in periodontal tissue regeneration. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 100, n. 5, p. 1435-1443, 2012.

XU, T.; XIN, H.; LI, M.; HUANG, H.; ZHOU, S.; LIU, J. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of N, O-quaternary ammonium chitosan. **Carbohydr Res**, v. 346, n. 15, p. 2445-2450, 2011.

XU, Z.; NEOH, K. G.; LIN, C. C.; KISHEN, A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 98, n. 1, p. 150-159, 2011.