RAI MATHEUS CARVALHO SANTOS

Influência da quitosana na biomodificação da dentina após remoção seletiva da lesão de cárie utilizando laser de ER:YAG. Análise clínica, da adaptação marginal da réplica da restauração e microbiológica

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

Área de concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona

Ribeirão Preto
2019

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

Catálogo na publicação

Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Santos, Rai Matheus Carvalho.

Influência da quitosana na biomodificação da dentina após remoção seletiva da lesão de cárie utilizando laser de ER:YAG. Análise clínica, da adaptação marginal da réplica da restauração e microbiológica. Ribeirão Preto, 2019.

“Versão corrigida da dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que se aloja o programa”

68p.:il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), área de concentração: Odontopediatria.

Versão corrigida

Orientadora: Silmara Aparecida Milori Corona

1. Quitosana; 2. Laser Er:YAG; 3. Dentina; 4. Dentes decíduos.

Folha de aprovação

Santos, RMC. **Influência da quitosana na biomodificação da dentina após remoção seletiva da lesão de cárie utilizando laser de ER: YAG. Análise clínica, da adaptação marginal da réplica da restauração e microbiológica.**

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

Programa: Odontopediatria.

Área de concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Profa. Dra.: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra.: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra.: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra.: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

RAI MATHEUS CARVALHO SANTOS

Nascimento: 17 de agosto de 1994 – Cabrobó/PE

Filiação: Givaniuson Antonio dos Santos
Maria Ribeiro de Carvalho Santos

2012-2016: Curso de graduação
Universidade Federal do Piauí

2016-2018: Curso de Pós-graduação em Odontopediatria, nível Mestrado.
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - FORP/USP.

Para Sophia, em nome de todas as crianças
que tornaram possível este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Profa. Silmara Corona, pela orientação durante todo o processo de trabalho, e pela paciência e serenidade no trato com minhas imperfeições.

Aos professores Soraya e Wilson Mestriner, por compreenderem as minhas inquietações e me apoiarem na busca por novas possibilidades.

Aos professores do programa de pós-graduação em Odontopediatria, dos quais destaco a Profa. Raquel Assed e o Prof. Paulo Nelson Filho, pelo esforço em proporcionar um curso produtivo e enriquecedor.

Ao Prof. Sérgio Salvador e à técnica Marina, pela contribuição fundamental na etapa de processamento e análise microbiológica do estudo.

À Profa. Aline Evangelista, pela preciosa ajuda na análise estatística.

Aos funcionários da FORP, dos quais destaco Fátima, Seu Zé e Karina, pela generosidade na contribuição de suas funções para o sucesso deste trabalho.

Aos diretores, professores e demais funcionários das escolas municipais de Ribeirão Preto, por me receberem com respeito e colaborarem para a realização das triagens.

Aos pais e responsáveis pelas crianças que participaram deste estudo, pelo esforço em comparecer às consultas de acompanhamento.

À Fabiana e Francine, pela importante ajuda no início da etapa clínica deste trabalho.

Aos meus amigos de pós-graduação, por tornarem este espaço de conhecimento um lugar também de sincero afeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 2016/14864-5) e Auxílio à Pesquisa (Processo nº 2017/00720-

4)

À Denise e Edson, pela amizade que rompe distâncias.

Ao Breno Antony, pela companhia que conforta, pelo cuidado e sorrisos diários. Também por me mostrar a vida sob outras perspectivas.

Aos meus pais, Maria e Givaniuson, e ao meu irmão, Renan. Pelo infindável apoio na minha caminhada profissional, por sempre acreditarem em mim e por terem investido em minha formação. Eu amo vocês!

“No escuro da noite, confessa a ti próprio que morrerias se te proibissem de escrever.

Procura a resposta nas profundezas do teu coração, no lugar onde as suas raízes se
estendem, e pergunte-se: preciso escrever?”

Rainer Maria Rilke

RESUMO

Santos, RMC. **Influência da quitosana na biomodificação da dentina após remoção seletiva da lesão de cárie utilizando laser de Er:YAG. Análise clínica, da adaptação marginal da réplica da restauração e microbiológica.** Ribeirão Preto, 2018. 68p. [Dissertação de mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

O objetivo deste estudo clínico foi avaliar a influência da quitosana na biomodificação da dentina após a remoção seletiva das lesões de cárie com o laser de Er:YAG em dentes decíduos, quanto à redução da quantidade de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus ssp*, e o comportamento clínico das restaurações realizadas. A amostra foi composta por 52 crianças que apresentaram lesão de cárie ativa atingindo dentina, localizada na superfície oclusal em molar decíduo. Para a análise microbiológica (n=10), os dentes foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de acordo com a remoção seletiva das lesões de cárie: laser de Er:YAG (250mJ/4Hz) ou contra-ângulo (método convencional) e o tratamento da superfície da dentina: sem biomodificação e com biomodificação (gel de quitosana a 2,5%). Foram realizadas coletas da dentina infectada, dentina afetada e após a biomodificação com gel de quitosana a 2,5%. As unidades formadoras de colônias (UFC/mg) foram contadas e os dados foram analisados por meio do teste Shapiro-Wilk e teste de Mann-Whitney para o laser de Er:YAG após aplicação da quitosana. Após a remoção seletiva da lesão de cárie com o laser de Er:YAG houve redução significativa na quantidade de *S. mutans* (p=0,0068). Para *Lactobacillus ssp* não foi observada diferença significativa entre os métodos de remoção (p=0,089). Após a biomodificação com gel de quitosana a 2,5%, houve redução significativa na quantidade de *S. mutans*, para ambos os métodos de remoção (p=0,0524). A aplicação de quitosana promoveu redução da quantidade de *Lactobacillus ssp*, após remoção seletiva pelo método convencional, mas não com laser de Er:YAG (p=0,000487). Para a análise clínica os dentes foram restaurados com adesivo (Single Bond Universal/3M) e resina composta (Z350 Filtek/3M) e avaliados nos períodos de 7 dias (baseline), 6 meses e 1 ano, utilizando os critérios USPHS modificados. Foram realizadas imagens fotográficas para auxiliar na análise clínica das restaurações. Para análise da adaptação marginal da réplica da restauração em microscopia eletrônica, os dentes foram moldados com silicona de adição. Os dados obtidos na análise clínica foram submetidos aos testes não-paramétrico de Kruskal Wallis e complementar de Dun (p< 0.05). Na análise clínica observou-se diferença significativa para a remoção seletiva da lesão da cárie utilizando o laser de Er:YAG com relação aos critérios descoloração e adaptação marginal (p<0,05). Concluiu-se que o laser de Er:YAG reduziu a quantidade de *S. mutans* e *Lactobacillus ssp* e a biomodificação com gel de quitosana a 2,5% foi efetiva para potencializar o efeito antimicrobiano, e que o comportamento clínico das restaurações não foi influenciado pelo método de remoção da lesão de cárie e biomodificação da dentina afetada.

Palavras-chave: Laser de Er:YAG; Quitosana; Dentina; Dentes decíduos

ABSTRACT

Santos, RMC. **Influence of chitosan on dentin biomodification after selective removal of caries lesion using Er: YAG laser. Clinical longitudinal, photographic analysis, marginal adaptation of the replica of the restoration and microbiological.** Ribeirão Preto, 2018. 68p. [Dissertação de mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

The objective of this clinical study was to evaluate the effect of Er: YAG laser for the removal of caries lesions in primary teeth, followed by the biomodification of dentin affected with 2.5% chitosan gel, reducing the amount of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus ssp*, and the clinical behavior of the performed restorations. The sample consisted of 52 children who presented lesions of active caries reaching dentin, located on the occlusal surface in a deciduous molar. For the microbiological analysis ($n = 10$), the teeth were randomly distributed in 4 groups according to the selective removal of caries lesions: Er: YAG laser (250mJ / 4Hz) or contra-angle (conventional method) and treatment of the dentin surface: without biomodification and with biomodification (chitosan gel). Dentin tissue was collected in three periods: before selective removal of the caries lesion, after selective removal of the caries lesion and after the dentin biomodification with chitosan gel. The colony forming units (CFU/mg) were counted and the data were analyzed by means of the Shapiro-Wilk test and Mann-Whitney test for the Er: YAG laser after application of chitosan. After the selective removal of the caries lesion with Er:YAG laser there was a significant reduction in the amount of *S. mutans* ($p = 0.0068$). For *Lactobacillus ssp*, no significant difference was observed between the removal methods ($p = 0.089$). After biomodification with 2.5% chitosan gel, there was a significant reduction in the amount of *S. mutans*, for both removal methods ($p=0.0524$). The application of chitosan promoted reduction of the amount of *Lactobacillus ssp* after selective removal by the conventional method, but not with Er: YAG laser ($p = 0.000487$). For the clinical analysis, the teeth were restored with adhesive (Single Bond Universal / 3M) and composite resin (Z350 Filtek / 3M) and evaluated in 7-day periods (baseline), 6 months and 1 year using modified USPHS criteria. Photographic images were taken to aid in the clinical analysis of the restorations. For analysis of the marginal adaptation of the replica of the restoration in electron microscopy, the teeth were molded with addition silicone. The data obtained in the clinical analysis were submitted to non-parametric Kruskal Wallis tests and Dun's complement ($p < 0.05$). In the clinical analysis, a significant difference was observed for the selective removal of the caries lesion using the Er: YAG laser in relation to the discoloration and marginal adaptation criteria ($p < 0.05$). It was concluded that the Er: YAG laser reduced the amount of *S. mutans* and *Lactobacillus ssp* and the biomodification with chitosan was effective to potentiate the antimicrobial effect, and that the clinical behavior of the restorations was not influenced by the method of removing the lesion from caries and biomodification of the affected dentin.

Keywords: Laser de Er:YAG; Chitosan; Dentin; Primary teeth

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma do delineamento experimental.....	32
Figura 2 -	Diagrama CONSORT, forma de recrutamento, alocação, acompanhamento e análise dos sujeitos da pesquisa.....	34
Figura 3 -	Fluxograma análise microbiológica.....	39
Figura 4 -	Fluxograma tratamento restaurador.....	41
Figura 5 -	Imagens clínicas e MEV.....	48
Figura 6 -	Imagens MEV.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Critérios USPHS modificados que serão utilizados durante a avaliação das restaurações	42
Tabela 2 -	Comparações estatísticas em Log (UFC+1) para a contagem de <i>S. mutans</i>	46
Tabela 3 -	Comparações estatísticas em Log (UFC+1) para a contagem de <i>Lactobacillus</i> ssp.....	47
Tabela 4 -	Resultados da análise clínica das restaurações utilizando os critérios USHPHS modificados.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Er:YAG	Erbium-doped Yttrium Aluminium Garnet Laser
USPHS	United States Public Health Service
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
EMLA	Eutectic Mixture of Local Anesthetics
PBS	Phosphate Buffered Saline
JPEG	Joint Photographic Experts Group
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. PROPOSIÇÃO.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
4. RESULTADOS.....	45
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

O tratamento de lesões de cárie foi aperfeiçoado ao longo do tempo com o objetivo de preservar a estrutura dental e impedir o ciclo restaurador repetitivo (Ericson et al., 2003; Borges et al., 2010; Borges et al., 2012). Para a mínima intervenção e máxima preservação dos tecidos dentários torna-se importante e indispensável à distinção clínica entre a dentina afetada e a dentina infectada (Massara et al., 2002). A dentina afetada corresponde à camada mais interna do tecido dentinário cariado e é passível de remineralização (Fusayama et al., 1966; Banerjee et al., 2000; Banerjee et al., 2003); a camada mais externa, denominada dentina infectada, é irreversivelmente desnaturada e não remineralizável (Fusayama, 1979).

Com base no conceito de odontologia minimamente invasiva, técnicas mais conservadoras têm sido recomendadas como alternativa ao método convencional de remoção de cárie, a fim de proporcionar mínimas alterações térmicas e teciduais, menor vibração e desconforto ao paciente (Sarmadi et al., 2018). O método convencional pode causar ansiedade e medo em pacientes, sendo estes os principais obstáculos à aceitação ao tratamento odontológico por crianças (Bussadori et al., 2006; Bittencourt et al., 2010; Li et al., 2018). A aquisição e perpetuação de atitudes negativas diante deste tratamento é um processo que na maioria das vezes tem início na infância e pode persistir na adolescência, ou até a idade adulta (Abreu et al., 2011).

O Laser de granada de ítrio e alumínio (Er:YAG) apresenta-se como uma alternativa viável aos instrumentos odontológicos de baixa e alta rotação (Aoki et al., 1998), pois é um método seguro de remoção do tecido cariado, reduz a necessidade de anestesia local (Tao et al., 2017) e reduz a sensibilidade, a vibração e a dor, proporcionando maior conforto ao paciente (Keller et al., 1988; Hibst, 2002; Li et al., 2018). O uso deste laser para o tratamento odontológico foi proposto em 1990 (Hibst & Keller, 1989) e desde então tem sido realizado com sucesso em dentes decíduos (Lula et al., 2009; Kalyoncu et al., 2018) e permanentes (Kidd, 2004; Maltz et al., 2012) sem alterações térmicas severas que poderiam provocar danos à polpa ou à estrutura dentária e tecidos circundantes (Ceballo et al., 2002; Shinari et al., 2012; Baraba et al., 2018).

Este laser possui comprimento de onda de 2940 nm, que coincide com o pico de absorção de água e radicais OH presentes nos tecidos mineralizados do dente (Keller e

Hibst, 1997; Hibst e Keller, 1989; Ramos et al., 2002). Esta absorção leva à produção de calor, vaporização da água que envolve os cristais de apatita e microexplosões resultantes do aumento da pressão das moléculas. A maior parte da energia liberada deste processo é utilizada durante a ablação do tecido cariado e o restante é difundido pelos tecidos adjacentes sem aumento extremo da temperatura pulpar (Hibst e Keller, 1989; Malta et al., 2006; Lizarelli et al., 2006; Bader e Krejci, 2006; Ana et al., 2006).

Além disso, o laser de Er:YAG possui efeito antimicrobiano na descontaminação do tecido tratado, ao destruir bactérias aeróbias e anaeróbias (Ando et al., 1996). O efeito bactericida deste laser sobre *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Enterococcus faecalis* foi observado por estudos *in vitro* (Ando et al., 1996; Kurkidome et al., 2010; Cheng et al., 2017). Outro estudo realizou PCR *real-time* para investigar a presença de bactérias cariogênicas gram-positivas e gram-negativas em cavidades preparadas com o laser de Er:YAG e observou ausência de contaminação bacteriana (Baraba et al., 2018).

A influência do laser de Er:YAG no processo de adesão da dentina irradiada, bem como o impacto sobre as fibras colágenas, ainda não se encontra totalmente esclarecida. Estudos mostram que o pré-tratamento da dentina com o laser de Er:YAG melhora a força adesiva na interface cimento-dentina (Pelozo et al., 2018) e pode ser vantajosa para a adesão de restaurações em resina composta (Kallis et al., 2018). Outros estudos mostram que a utilização do laser de Er:YAG provoca alterações na força de ligação adesiva da restauração ao dente devido às mudanças microestruturais na dentina causadas pela irradiação, tais como aumento da profundidade de crateras dentinárias (Nahas et al., 2018), ausência de *smear layer* e desnaturação das fibras colágenas, o que pode dificultar a penetração do adesivo nos túbulos dentinários (Ramos et al., 2002; Giachetti et al., 2004; Dunn et al., 2005; Xu et al., 2011; Firat et al., 2012; Profeta et al., 2012; Moosavi et al., 2016).

A elucidação da influência do laser de Er:YAG sobre o mecanismo de adesão, é particularmente importante para o tratamento de dentes decíduos, devido a menor densidade e diâmetro dos túbulos dentinários e menor condutibilidade hidráulica, o que a torna menos permeável aos sistemas adesivos que a dentina dos dentes permanentes (Koutsi et al., 1994).

A dentina é histologicamente complexa e intrinsecamente úmida (Neves et al., 2011), portanto a sua biomodificação afeta diretamente o processo de adesão a materiais

restauradores (Marshall et al., 1999) e pode melhorar a resistência mecânica e à degradação hidrolítica e enzimática das fibras colágenas (Scheffel et al., 2014). A possibilidade de incorporar um biopolímero na dentina para fortalecer a matriz de colágeno foi estudada (Finger & Balkenhol, 2000; Xu et al., 2011; Profeta et al., 2012; Fawzy et al., 2013).

A quitosana é um polissacarídeo natural obtido através da desacetilação alcalina da quitina (Muzzarelli & Rochetti, 1993), o segundo polissacárido mais abundante na natureza, depois da celulose (Senel & McClure, 2004), tornando sua utilização ecologicamente interessante. É biocompatível, biodegradável e atóxica para células humanas (Venter et al., 2006; Raafat & Sahl, 2009).

A natureza polifuncional da quitosana determina uma das mais altas capacidades de ligação entre os polissacarídeos naturais (Pestov e Bratskaya, 2016). Sua estrutura química única formando um polícatión linear, com elevada densidade de carga e de grupos reativos, e inúmeras ligações de hidrogênio (Kumar et al., 2000), possibilita diversas aplicações devido a facilidade em ser processada como fibra, filme, esponja, gel ou solução (Younes e Rinaldo, 2015).

As aplicações mais importantes da quitosana se devem ao seu carácter hidrofílico e propriedades antimicrobianas (Younes e Rinaldo, 2015), uma vez que os seus grupos glucosamina interagem com o DNA celular dos microorganismos (Zakrzewska et al., 2005; Je & Kim, 2006). Dessa forma, a transcrição do DNA e a síntese do mRNA são inibidos (Liu et al., 2001; Rabea et al., 2004), suprimindo a síntese proteína (Helander et al., 2001; Dutta et al., 2004) e a atividade metabólica das bactérias (Raafat e Sahl, 2009).

Estudos *in vitro* observaram que a quitosana inibiu o crescimento de diferentes espécies bacterianas, tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* (Choi et al., 2001; Ikinici et al., 2002; Chen e Chung, 2012; Wassel e Khattab, 2017; Yadav et al., 2017), *Enterococcus faecalis* (Del Carpio-Perochena et al., 2017) e interferiu na adesão e na formação de biofilme primário (Costa et al., 2013; Costa et al., 2014). Embora a atividade antimicrobiana da quitosana seja bem conhecida, até a data ainda não há relatos quanto a sua ação na dentina de dentes decíduos.

Além desta atividade antimicrobiana, observou-se que a quitosana fornece um reforço da matriz orgânica da dentina através de ligações cruzadas. As ligações cruzadas ou *cross links*, consistem na união de duas ou mais moléculas mediante ligações químicas

do tipo covalentes (Tjäderhane et al., 2013; Scheffel et al., 2014). Beltrame et al. (2018) observou que a solução de quitosana fosforilada alcalina 0,5% teve um efeito favorável na manutenção da integridade de fibras colágenas. Estudos recentes não encontraram influência da quitosana na molhabilidade da dentina erodida (Uruhahy et al., 2017) nem na composição química e estrutural da dentina afetada pela cárie (Curylofo-Zotti et al., 2017). No entanto, a falta de um maior número de evidências científicas e a ausência de estudos clínicos longitudinais impossibilitam conclusões mais consistentes.

Portanto, frente aos benefícios da remoção seletiva do tecido cariado com laser de Er:YAG em relação ao método convencional utilizando brocas e na tentativa de superar sua possível interferência no processo de adesão dos materiais resinosos, torna-se importante avaliar o efeito da remoção seletiva das lesões de cárie com laser de Er:YAG seguida pela biomodificação da dentina residual com quitosana com relação à atividade antimicrobiana e ao comportamento clínico longitudinal das restaurações.

2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da quitosana na biomodificação da dentina de dentes decíduos após remoção seletiva da lesão de cárie utilizando laser de Er:YAG. O estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- 1) Análise microbiológica do tecido dentinário coletado, por meio da contagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus ssp*
- 2) Avaliar clinicamente as restaurações de resina composta preparadas após a remoção seletiva da lesão de cárie utilizando laser de Er:YAG e biomodificação da dentina com quitosana nos períodos: após polimento (*baseline*), seis e doze meses, por meio de exame clínico utilizando os critérios USPHS modificados.
- 3) Avaliar *ex vivo* a adaptação marginal da réplica da restauração em MEV, por meio da análise da integridade marginal nos períodos após polimento (*baseline*), seis e doze meses da realização da restauração

3. MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Os fatores estudados foram o método empregado para a remoção seletiva de lesões de cárie, em dois níveis: laser de Er:YAG (250mJ/4 Hz) e método convencional; e a biomodificação da dentina em dois níveis: gel de quitosana a 2,5% e sem biomodificação. A amostra do experimento foi composta por 52 crianças e 80 molares decíduos com lesão de cárie ativa e cavitação atingindo dentina localizada na superfície oclusal. As variáveis de resposta analisadas foram: 1) avaliação clínica longitudinal das restaurações (n=20) realizadas nos períodos: após polimento (*baseline*), 6 meses e 12 meses, por meio de exame clínico USPHS modificado; 2) avaliação *ex vivo* da adaptação marginal da réplica da restauração (n=20) em microscopia eletrônica de varredura, por meio do cálculo da análise da integridade marginal, também realizada nos períodos: 7 dias após a realização da restauração, 6 meses e 12 meses e 3) análise microbiológica da dentina (n=10) por meio da contagem de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus ssp.* (Figura 1)

Figura 1 - Fluxograma do delineamento experimental

Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (C.A.A.E. nº 68339116.4.0000.5419) e registrado na plataforma Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (Identificação do ensaio – Nº UTN: U1111-1213-4644). O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos pais ou responsável pela criança.

Seleção dos pacientes e dentes

Foi realizado exame clínico em 3180 crianças na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo - FORP / USP e em escolas públicas municipais, de ambos os gêneros, com idade dentre 7 e 9 anos. Destas, apenas 52 (32 meninos e 20 meninas) apresentaram todos os critérios de inclusão e a aceitação dos pais em participar da pesquisa. O guia CONSORT (Schulz et al., 2010) para ensaios clínicos randomizados foi seguido para o delineamento do presente estudo. A figura 2 representa o diagrama CONSORT, que discrimina em detalhes a forma de recrutamento, alocação, acompanhamento e análise dos sujeitos da pesquisa, onde foi observada perda no acompanhamento de 12 crianças, resultando em 25 meninos e 15 meninas que apresentaram condição final para análise.

Figura 2 - Diagrama CONSORT, forma de recrutamento, alocação, acompanhamento e análise dos sujeitos da pesquisa

As crianças foram submetidas à profilaxia com pasta de pedra pomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água, realizada com taça de borracha (Jon, São Paulo, SP, Brasil) em superfícies lisas e escova de Robinson (Jon, São Paulo, SP, Brasil) nas

superfícies oclusais, ambos conectados ao micromotor (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil). As crianças previamente selecionadas foram avaliadas clinicamente sob iluminação adequada. As fotografias intrabuciais foram realizadas com Câmera Intra-oral Incam LX (SAEVO, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para controle fotográfico dos dentes analisados. Em seguida, foi realizado exame radiográfico padronizado com radiografias digitais interproximais e periapicais, utilizando o sensor de radiografia digital (CDR Elite, Fona, São Paulo, SP, Brasil) com posicionador.

As crianças receberam também aplicação tópica de flúor e instrução de higiene bucal individualizada. Os critérios de inclusão da criança foram a presença de pelo menos uma lesão de cárie ativa, com cavitação atingindo dentina de profundidade rasa a média, localizada na superfície oclusal em molar decíduo, com vitalidade pulpar (resposta positiva ao teste térmico realizado), utilizando Endofrost (Roeko, Langenau, Germany), ausência de selantes, restaurações de amálgama ou resina composta.

Foram excluídas da pesquisa as crianças que apresentaram dentes com dor e/ou sensibilidade espontânea, fistula, edema, mobilidade não compatível com o estágio de rizólise e, ao exame radiográfico, presença de radiolucidez na região de furca e periápice, aumento do espaço periodontal e reabsorção dentária interna/externa. Os pais ou responsáveis foram informados quanto ao propósito do estudo. Foram fornecidos detalhes sobre o tratamento com laser, incluindo possíveis ruídos, estalos e odor associados ao processo de ablação. Foram preenchidas também as fichas de anamnese e os odontogramas, relativos às condições gerais de saúde e dos dentes de cada criança.

Os dentes das crianças que apresentaram necessidade de tratamento e que não foram selecionados para a pesquisa receberam tratamento odontológico necessário. Em algumas crianças, foi necessária a realização de procedimentos referentes à adequação do meio bucal, exodontias de dentes em estágio final de rizólise, grandes destruições coronárias e raízes residuais. Após a conclusão do tratamento odontológico, as crianças que apresentaram disfunção ortodôntica foram encaminhadas para avaliação.

Medidas de biossegurança para uso do laser de Er:YAG

A sequência técnica deste trabalho foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Laser, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo obedecendo às normas de segurança: sala dotada de luz externa de aviso, que permaneceu acesa durante a utilização do equipamento, porta com trava, exaustor e sistema de controle de temperatura (mantida

em torno de 23°C). Todos os indivíduos presentes durante os procedimentos com laser utilizaram óculos de proteção para o comprimento de onda específico do aparelho.

Remoção seletiva das lesões de cárie

A randomização das crianças foi realizada utilizando uma planilha de computador. Com a ajuda de um gerador de números aleatórios disponível no website <http://randomnumbergenerator.intemodino.com/pt/>, as crianças tiveram seus nomes numerados a fim de ordenar o tratamento. O molar decíduo de cada criança que for incluído na pesquisa, foi distribuído aleatoriamente entre o método de remoção da lesão de cárie, laser de Er:YAG ou método convencional, por meio de lançamento de moeda (cara ou coroa). O mesmo procedimento foi realizado para a biomodificação da dentina, quitosana a 2,5% ou sem biomodificação.

O anestésico EMLA (Laboratório Astrazeneca, Cotia SP, Brasil), na quantidade de 0,5 g, foi aplicado por meio de haste flexível com ponta de algodão (Cotonete®, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP) na mucosa jugal e nas papilas gengivais dos dentes decíduos e foi realizada a injeção da solução anestésica local contendo mepivacaína 2% associada à epinefrina 1:100.000.

Antes da colocação do grampo para o isolamento absoluto do campo operatório, foi realizada a seleção da cor da resina composta (Z350; 3M ESPE, São Paulo, SP, Brasil) que foi utilizada nas restaurações das cavidades, por meio de escala de cores Vita (Wilcos do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil).

Os dentes receberam isolamento absoluto com lençol de borracha (Madeitex, São José dos Campos, SP, Brasil), e foram utilizados grampos de vários números (Duflex, SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), de acordo com a morfologia dentária de cada molar decíduo (Croll, 1995). Após a conclusão do isolamento absoluto, foi realizada a remoção seletiva da lesão de cárie, empregando laser de Er:YAG ou método convencional, de acordo com sorteio previamente realizado.

No método em que foi utilizada a irradiação a laser, a remoção seletiva da lesão de cárie foi realizada com laser de Er:YAG (Fidelis Er III, Fotona, Ljubljana, Eslovenia), utilizando laser de Er:YAG (250 mJ/4 Hz) no modo de MSP, usando uma caneta (R02), com a distância focal de 7 mm, pulso de energia de 250 mJ, frequência de impulso de 4 Hz, produção do diâmetro do feixe de 0,9 mm, densidade de energia de 39 J / cm², e sob

aspersão de água (6 mL / min) (Valério et al., 2016).

No método convencional, a remoção seletiva do tecido cariado foi realizada com brocas carbide esféricas (KG Sorensen, BSP, Brasil) compatíveis com o tamanho da cavidade, em baixa rotação (Contra-ângulo 1:1 L micro-series, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Quando necessário, o acesso à lesão de cárie (remoção do esmalte superficial) foi realizado com pontas diamantadas esféricas, também compatíveis com a cavidade (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em alta rotação (Contra-ângulo 1:5 Lmicro-series, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Para a remoção seletiva do tecido cariado, a dentina necrótica foi completamente removida das paredes circundantes e na parede pulpar foi mantida a dentina afetada passível de remineralização (Kidd, 2004; Thompson et al., 2008; Maltz et al., 2013). A verificação da remoção seletiva da lesão de cárie foi realizada de acordo com critérios clínicos de dureza, empregando curetas (Maltz et al., 2007).

Análise microbiológica

A análise microbiológica envolveu 27 crianças, com 40 lesões de cárie na superfície oclusal em molares decíduos.

Para a análise microbiológica (n=10) foram realizadas três coletas por dente nos seguintes períodos: antes da remoção seletiva da lesão de cárie (baseline), após a remoção da lesão de cárie e após a biomodificação da dentina com quitosana.

O tecido remanescente da parede pulpar foi coletado com curetas estéreis #11, #111/2, e #12 (Duflex, SSWhite, Juiz de Fora, MG, Brasil) para análises microbiológicas. O tecido coletado foi imediatamente transferido para um frasco contendo 1ml de PBS, pH 7.0, estéril, em transporte médio. Os frascos foram mantidos em uma caixa térmica com gelo e levadas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para processamento dentro de 2 horas.

O peso do tecido coletado foi calculado pela diferença entre o peso do conjunto inteiro (tubo, solução de PBS e tecido coletado) e o peso do conjunto previamente determinado sem o tecido. O peso foi registrado antes e após o procedimento. O número de bactérias obtidas por quantidade de tecido coletado foi usado para estimar o número de bactérias presentes em 1mg de dentina (UFC/mg).

As amostras do tecido coletado foram suspensas em 1 ml de solução de NaCl a

0,9% e sonicadas a uma amplitude de 20% por 2 minutos usando um sonicador (CL-334 Digital Fischer Scientific Sonicator, Park Lane, Pittsburgh, USA) para dispersar o agregado bacteriano. Desta suspensão, uma alíquota de 100 µL da suspensão sonicada foi diluída em solução de NaCl a 0,9% e seis diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) foram realizadas em duplicata pela técnica de contagem de gotas.

Subsequentemente, alíquotas de 50 µl obtidas das diluições foram cultivadas em duplicata sobre a superfície de dois meios de cultura: Ágar rogosa (Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, Md., USA) para identificação de *Lactobacillus sp* e Ágar Mitis Salivarius (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado com sacarose e bacitracina para *Streptococcus mutans*. Todas as placas foram incubadas em ambiente microaerófilo a 37° por 48h. Então, as colônias foram contadas macroscopicamente ou, quando necessário, utilizando um microscópio estereoscópio baseado na morfologia de suas colônias. As placas contendo entre 30 e 300 colônias foram usadas para determinar as unidades formadoras de colônias por miligrama. A reprodutibilidade do método de contagem foi avaliado pela comparação entre as contagens de microorganismos de cada amostra, comparando as placas A e B.

Todo o processamento microbiológico foi realizado por um operador único sob supervisão de uma técnica em microbiologia com experiência em microbiologia oral.

Figura 3 - a) planilha eletrônica b) exame clínico c) coleta da dentina infectada d) análise microbiológica da dentina infectada e) depósito da dentina em tudo de eppendorf f) utilização do laser de Er:YAG g) utilização da broca carbide montada em baixa rotação h) coleta da dentina afetada i) análise microbiológica da dentina afetada j) biomodificação da dentina com gel de quitosana a 2,5% k) coleta da dentina após biomodificação com gel de quitosana a 2,5% l) análise microbiológica da dentina biomodificada com quitosana m) restauração final

Preparo do gel de quitosana

Foram pesadas 2,5 gramas de quitosana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) de baixo peso molecular (75-85% de desacetilação) (Chung et al., 2016), que foi adicionada lentamente a 100 ml de solução de ácido acético a 1%, sob agitação magnética (Marconi Equip. Lab. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) durante 20 minutos de agitação (tempo suficiente para solubilizar o polissacarídeo).

Para evitar a agregação das partículas e elevar o pH da solução, foi adicionado 1mol/L de solução NaOH (Daood et al., 2013; Fawzy et al., 2013).

Tratamento Restaurador

Para os dentes destinados a biomidificação com gel de quitosana a 2,5%, foi utilizado um microbrush para aplicação do gel de quitosana por 15 segundos, seguida de secagem com papel absorvente.

O sistema adesivo autocondicionante Single Bond Universal (3m ESPE, São Paulo, SP, Brasil) foi aplicado com aplicador descartável (KG brush, KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), no esmalte e dentina de forma ativa, em seguida foi aplicado um leve jato de ar e realizada a fotopolimerização (Thanaratikul et al., 2016, Muller et al., 2017). Para a confecção da restauração foi inserida a resina composta Z350 (3M ESPE, São Paulo SP, Brasil) em incrementos de até 2 mm com espátula para resina e fotopolimerização, devolvendo a forma anatômica aos dentes.

Terminada a restauração, foi removido o isolamento absoluto e realizado ajuste oclusal com papel carbono (AccuFilm, Parkell, Farmingdale, NY, EUA) e pontas diamantadas para acabamento (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil). As crianças retornaram após sete dias para polimento final da restauração com pontas abrasivas (Enhance, Dentisply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil)

Figura 4 - **a)** planilha eletrônica **b)** gerador de números aleatórios **c)** laser de Er:YAG, método convencional, molar decíduo com lesão de cárie **d)** lançamento de moeda (cara ou coroa) **e)** escala de cores Vita 3D **f)** seringa carpule **g)** isolamento absoluto do campo operatório **h)** sistema adesivo **i)** resina composta **j)** aspecto final da restauração

Avaliação clínica das restaurações

Os dentes foram cuidadosamente avaliados por meio de análise clínica e fotográfica nos seguintes momentos: 7 dias após a confecção da restauração (após o polimento - *baseline*), 6 meses e 12 meses.

A análise clínica das restaurações foi realizada por três examinadores que não foram informados sobre qual método de remoção seletiva do tecido cariado e de biomodificação havia sido empregado naquela restauração avaliada (teste cego) por meio de exame visual e tátil, com emprego de instrumento de ponta romba seguindo os critérios USPHS modificados, que incluem a análise da retenção, descoloração marginal, cárie secundária e adaptação marginal.

As restaurações foram classificadas em 3 categorias: *Alpha* – quando o critério avaliado não apresentar problemas e a restauração estiver em perfeita condição; *Bravo* – quando o critério avaliado apresentar pequenas falhas, porém, clinicamente aceitáveis e *Charlie* – quando o critério avaliado apresentar falhas relevantes e a restauração necessitar ser substituída. (Tabela 1).

Tabela 1- Critérios USPHS modificados que serão utilizados durante a avaliação das restaurações

Categoria	Escore	Critério
Retenção	Alpha	Sem perda de material restaurador
	Charlie	Com perda de material restaurador
Descoloração marginal	Alpha	Sem descoloração marginal
	Bravo	Leve descoloração marginal, sem penetração axial
	Charlie	Descoloração axial com penetração axial
Cárie secundária	Alpha	Sem recorrência de cárie
	Charlie	Com recorrência de cárie
Adaptação marginal	Alpha	Perfeitamente adaptáveis, sem margens visíveis
	Bravo	Margem visível, porém clinicamente aceitável
	Charlie	Desadaptação marginal, falha clínica

O mesmo examinador que realizou a análise clínica, verificou as fotografias dos molares decíduos restaurados em um monitor de tela plana de alta resolução e comparou os dados obtidos na análise clínica com os da fotografia chegando assim, a um resultado preciso.

Avaliação da adaptação marginal da réplica das restaurações

Ao término de cada período (7 dias, 6 meses e 12 meses) os dentes foram moldados com moldeiras parciais perfuradas de alumínio (Golgran Ind. Odontológica, São Paulo, SP, Brasil) e silicona de adição (Express XT - 3M ESPE). Os moldes foram ser circundados com cera fundida utilizando gotejador elétrico (Simp-Plaster) para auxiliar no vazamento da resina epóxi (EpoHeat, Buehler, Chicago, EUA). As réplicas das restaurações obtidas foram fixadas em *stubs* de alumínio com fita carbono dupla face, metalizadas com fina cobertura de ouro e analisadas em MEV em aumento de 22 x.

A análise foi realizada por um examinador com experiência em microscopia eletrônica de varredura que desconhece os métodos de remoção de lesão de cárie utilizados. Os artefatos do modelo foram desconsiderados. Foi verificada a adaptação marginal da restauração de resina composta e o cálculo da porcentagem da integridade marginal foi realizado por meio da medida da área integra e da área que apresenta *gap* em relação à margem da restauração (Garcia Godoy et al., 2010).

Análise estatística

Para a análise clínica foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* ($p \leq 0,05$) e o método de *Dunn* para a comparação entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Para a análise microbiológica, os dados foram testados quanto à normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk. No baseline, para ambos os métodos e microorganismos, houve distribuição normal, assim, foi utilizado teste t para amostras independentes. Após remoção seletiva e a biomodificação com gel de quitosana a 2,5%, o grupo Broca apresentou distribuição não normal para todas as situações e o grupo laser de Er:YAG apresentou distribuição não normal após a aplicação de Quitosana (apenas para *S mutans*), assim, foi utilizado teste de Mann-Whitney. A comparação entre os tempos (baseline, após remoção seletiva da lesão de cárie e após biomodificação com gel de quitosana a 2,5%) para Broca (*S mutans* e *Lactobacillus spp*) e laser de Er:YAG (*S mutans*) foi realizada por teste de Friedman; e a comparação de Laser de Er:YAG (*Lactobacillus spp*) foi realizada por ANOVA de medidas repetidas.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS versão 20.0 (SPSS Inc., v20, Chicago, IL, EUA).

4. RESULTADOS

Análise microbiológica

Na comparação entre os métodos de remoção seletiva da lesão de cárie, método convencional *vs* laser de Er:YAG, verificou-se que no baseline, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para ambos os microorganismos (*S. mutans* $p=0,078$; *Lactobacillus ssp* $p=0,703$). Após a remoção seletiva da lesão de cárie foram encontradas diferenças significativas na quantidade de *S. mutans* ($p=0,0068$), sendo maior Log (UFC+1) encontrado para o grupo método convencional. Para *Lactobacillus ssp* não foi observada diferença significativa entre os métodos de remoção ($p=0,089$). Após a biomodificação com gel de quitosana a 2,5%, houve redução significativa da quantidade de *S. mutans* para ambos os métodos de remoção ($p=0,0524$). A aplicação de quitosana promoveu redução da quantidade de *Lactobacillus ssp*, após remoção seletiva pelo método convencional, mas não com laser de Er:YAG ($p=0,000487$).

Para o método convencional verificou-se que após a remoção seletiva não houve redução da quantidade de microorganismos (*S. mutans* $p=0,172$; *Lactobacillus ssp* $p=0,057$). A aplicação de quitosana promoveu redução significativa da quantidade de *S. mutans* e *Lactobacillus ssp* em comparação ao *baseline* ($p<0,001$).

Para o método empregando o laser de Er:YAG observou-se que após a remoção seletiva com laser de Er:YAG não houve redução da quantidade de microorganismos (*S. mutans* $p=0,221$; *Lactobacillus ssp* $p=0,098$). A biomodificação com gel de quitosana a 2,5% promoveu redução significativa, de ambos os microorganismos, em comparação a remoção (*S. mutans* $p=0,042$; *Lactobacillus ssp* $p=0,017$) e ao *baseline* (*S. mutans* e *Lactobacillus ssp* $p<0,001$).

Tabela 2 - Comparações estatísticas em Log (UFC+1) para a contagem de *S. mutans*.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	Intervalo		Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil
					Limite Inferior	Limite Superior				
Método convencional	Baseline ^{A,a}	7.59	7.60	0.79	7.10	8.08	5.94	8.52	7.17	8.28
	Remoção seletiva da lesão de cárie ^{A,ab}	6.19	6.90	2.24	4.80	7.58	0.00	7.81	6.19	7.19
	Biomodificação com gel de quitosana 2,5% ^{A,b}	5.20	5.69	2.19	3.84	6.56	0.00	7.03	4.64	6.70
Laser de Er:YAG	Baseline ^{A,a}	6.88	6.82	0.90	6.32	7.44	5.68	8.75	6.17	7.43
	Remoção seletiva da lesão de cárie ^{B,a}	5.73	5.87	0.77	5.25	6.21	4.30	7.11	5.25	6.11
	Biomodificação com gel de quitosana ^{A,b}	4.32	4.66	1.62	3.32	5.32	0.00	5.90	4.25	4.95

^ABletras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre o método convencional e o laser de Er:YAG para o mesmo tempo; ^{ab} letras minúsculas iguais indica semelhança estatística entre os tempos para o mesmo tratamento.

Tabela 3 - Comparações estatísticas em Log (UFC+1) para a contagem de *Lactobacillus ssp.*

		Média	Mediana	Desvio Padrão	Intervalo		Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil
Método convencional	Baseline ^{A,a}	6.72	6.79	1.03	6.08	7.36	4.30	7.80	6.32	7.55
	Remoção seletiva da lesão de cárie ^{A,ab}	5.05	5.68	2.04	3.79	6.31	0.00	7.18	4.17	6.25
	Biomodificação com gel de quitosana 2,5% ^{A,b}	3.08	3.60	2.26	1.68	4.48	0.00	5.77	0.00	5.05
Laser de Er:YAG	Baseline ^{A,a}	6.91	6.94	1.17	6.18	7.64	4.87	8.20	5.92	8.02
	Remoção seletiva da lesão de cárie ^{A,a}	6.35	6.35	0.90	5.79	6.91	4.60	7.72	5.80	7.08
	Biomodificação com gel de quitosana ^{B,b}	5.78	5.82	0.97	5.18	6.38	3.60	6.97	5.31	6.42

^Aletras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística entre o método convencional e o laser de Er:YAG para o mesmo tempo; ^{ab} letras minúsculas iguais indica semelhança estatística entre os tempos para o mesmo tratamento.

Análise clínica

Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as restaurações realizadas após a remoção seletiva de lesões de cárie utilizando o laser de Er:YAG e o método convencional, com ou sem biomodificação utilizando gel de quitosana a 2,5%, avaliadas segundo os critérios USHPH modificados para os critérios retenção e cárie secundária ($p>0.05$). Para os critérios descoloração marginal e adaptação marginal observou-se diferença estatisticamente significativa a partir dos 6 meses de avaliação para os método empregando o laser de Er:YAG com e sem biomodificação utilizando quitosana ($p<0,05$).

Figura 5 - A) Remoção seletiva pelo método convencional (broca) sem biomodificação com gel de quitosana a 2,5% B) Remoção seletiva pelo método convencional (broca) com biomodificação com gel de quitosana a 2,5% C) Remoção seletiva com laser de Er:YAG sem biomodificação com gel de quitosana a 2,5% D) Remoção seletiva com laser de Er:YAG com biomodificação com gel de quitosana a 2,5% 1) Avaliação clínica inicial (baseline) 2) MEV inicial (baseline) 3) Avaliação clínica um ano 4) MEV um ano

Tabela 4 - Resultados da análise clínica das restaurações utilizando os critérios USHPHS modificados

Remoção cárie	Biomodificador	Descoloração marginal						Adaptação marginal				Retenção	Cárie
		Avaliação		A*	B**	#	<i>p (sig.)</i>	A*	B**	#	<i>p (sig.)</i>	A *	A*
Laser de Er:YAG	Gel de quitosana 2,5%	Baseline	n=20	20 (100%)	0	a		20 (100%)	0	a		20 (100%)	20 (100%)
		6 meses	n=18	13 (72,23%)	5 (27,77%)	b	0,0361	12 (66,67%)	6 (33,34%)	b	0,0249	18 (100%)	18 (100%)
		1 ano	n=18	13 (72,23%)	5 (27,77%)	b		14 (77,78%)	4 (22,22%)	b		18 (100%)	18 (100%)
Laser de Er:YAG	Sem gel de quitosana 2,5%	Baseline	n=20	20 (100%)	0	a		20(100%)	0	a		20 (100%)	20 (100%)
		6 meses	n=19	15 (78,94%)	4 (21,05%)	b	0,0306	14 (78,94%)	5 (21,05%)	b	0,0439	19 (100%)	19 (100%)
		1 ano	n=19	13 (68,42%)	6 (31,58%)	b		14 (78,94%)	5 (21,05%)	b		19 (100%)	19 (100%)
Método convencional (broca)	Gel de quitosana 2,5%	Baseline	n=20	20 (100%)	0			20 (100%)	0			20 (100%)	20 (100%)
		6 meses	n=19	18(94,73%)	1 (5,27%)		0,5679	18(94,73%)	1 (5,27%)		0,3390	19 (100%)	19 (100%)
		1 ano	n=19	18(94,73%)	1 (5,27%)		<i>ns</i>	17 (89,47%)	2 (10,53%)		<i>ns</i>	19 (100%)	19 (100%)
Método convencional (broca)	Sem gel de quitosana 2,5%	Baseline	n=20	20 (100%)	0			20 (100%)	0			20 (100%)	20 (100%)
		6 meses	n=19	18(94,73%)	1 (5,27%)		0,5761	18(94,73%)	1 (5,27%)		0,5761	19 (100%)	19 (100%)
		1 ano	n=18	17 (94,45%)	1 (5,55%)		<i>ns</i>	17 (94,45%)	1 (5,55%)		<i>ns</i>	18 (100%)	18(100%)

Kruskal-wallis e teste de Dunn ($p>0,05$)

* Alpha

** Beta

não foram observados critério Charles no estudo

ns = não significante estatisticamente

Análise por MEV

A adaptação marginal das restaurações foi realizada por meio da análise das réplicas das restaurações analisadas por MEV. Análise quantitativa revelou que os dentes tratados com laser de Er:YAG apresentaram 10% de fendas em toda a extensão da restauração. Para aqueles dentes preparados com o método convencional, foram encontrados 20% de fendas no ângulo cavossuperficial. Os dentes que receberam a quitosana apresentaram uma redução de 5% no valor total de fendas apresentadas.

Figura 6 - A) Remoção seletiva pelo método convencional (broca) sem biomodificação com gel de quitosana a 2,5% B) Remoção seletiva pelo método convencional (broca) com biomodificação com gel de quitosana a 2,5% C) Remoção seletiva com laser de Er:YAG sem biomodificação com gel de quitosana a 2,5% D) Remoção seletiva com laser de Er:YAG com biomodificação com gel de quitosana a 2,5% 1) Avaliação por MEV inicial (baseline) 2) Avaliação por MEV 6 meses 3) Avaliação por MEV 1 ano

5. DISCUSSÃO

O tratamento da cárie em dentes decíduos e permanentes têm se baseado na remoção seletiva do tecido cariado, que consiste na remoção completa da dentina infectada e manutenção da dentina afetada, capaz de se remineralizar, na parede pulpar (Massara et al., 2002; Kidd, 2004). Além de proporcionar a mínima intervenção e máxima preservação dos tecidos dentários (Peters e McLean, 2001; Brostek et al., 2006), esta técnica é tão efetiva quanto a remoção completa do tecido cariado quanto à redução bacteriana da dentina contaminada (Bitello-Firmino et al., 2018).

A utilização de laser também vem sendo realizada para o tratamento das lesões de cárie (Hamidi et al., 2015; Valério et al., 2016; Galafassi et al., 2017) e representa uma alternativa ao método convencional devido ao seu efeito bactericida contra *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Enterococcus faecalis* (Ando et al., 1996; Cheng et al., 2017) e vantagens que fornecem conforto ao paciente, tais como menor ruído, dor e pressão (Keller et al., 1998; Hibst et al., 2002; Li et al., 2018), sendo a técnica de preferência pelas crianças (Polizeli et al., 2016).

Os resultados desse estudo mostraram que houve uma redução da microbiota cariogênica (*Streptococcus mutans*) para o laser de Er:YAG. Resultados similares foram observados por Valério et al. (2016) para dentes decíduos em um estudo clínico randomizado *split-mouth* e por Dommisch et al. (2008) em dentes permanentes, embora nestes estudos não tenham sido verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os métodos de remoção de cárie.

A redução bacteriana observada pode ser atribuída à remoção da dentina necrótica e altamente infectada. Embora os métodos não tenham conseguido eliminar completamente todos os microorganismos viáveis da cavidade, a quantidade de bactérias remanescentes é clinicamente irrelevante e aceitável (Dommisch et al., 2008), em concordância com o conceito de que algumas bactérias permanecem dentro da dentina afetada após a remoção seletiva das lesões de cárie sem apresentar riscos à saúde (Kidd, 1993).

O efeito bactericida da irradiação laser depende, em parte, das condições bacterianas (Wilson et al., 1993), como a plasticidade genética que determina a sua resposta ao estresse e variações do meio ambiente (Dobrindt & Hacker, 2001). Neste

estudo foram analisadas *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus ssp* devido à sua maior associação com a cárie (Kidd et al., 1993). Estas espécies são gram-positivas e portanto possuem estrutura celular resistente que dificultam sua eliminação (Moritz et al., 2000). No entanto, assim como outras bactérias da microbiota bucal, elas podem ter suas estruturas modificadas pelo aumento da temperatura (Ando et al., 1996). Devido ao seu efeito térmico, o laser de Er:YAG reduz a viabilidade bacteriana (Schoop et al., 2004) sem oferecer danos às estruturas dentárias remanescentes (Dos Santos Antonio et al., 2012; Kita et al., 2015; Raucci-Neto et al., 2015).

De acordo com Kukidome et al. (2010), devido à baixa penetrância do seu comprimento de onda, a energia do laser de Er:YAG é absorvida pela *smear layer* e pode não ser capaz de atingir os tecidos mais profundos. Portanto, seria benéfica a incorporação de biomateriais à terapia laser para promover a inativação dos microorganismos remanescentes viáveis. Neste estudo, a remoção seletiva das lesões de cárie foi seguida pela biomodificação da dentina residual com quitosana de baixo peso molecular (100.000 g/mol), por apresentar melhor atividade antimicrobiana (Hayashi et al., 2007) e maior efeito antibacteriano (Busscher et al., 2008; Costa et al., 2014; Sarwar et al., 2014; Camacho-Alonso et al., 2017). O gel de quitosana na concentração de 2,5% é justificado em função de estudos prévios mostrarem que as concentrações 1% e 1,5% tiveram uma atividade antimicrobiana menor do que concentrações mais altas (Mahapoka et al., 2012).

Nossos resultados mostraram que a quitosana aumentou o percentual de redução microbiana em ambos os grupos (laser de Er:YAG e método convencional) e para ambos os microorganismos (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus ssp*) em comparação ao baseline. Esses resultados estão de acordo com estudos de Pasquantonio et al. (2008) que observaram inibição do *Streptococcus mutans* pela quitosana em qualquer concentração ou tempo de exposição investigada. Busscher et al. (2008) mostraram redução na viabilidade do biofilme após a biomodificação com quitosana quando comparado ao grupo controle e Costa et al. (2014) reportaram inibição da aderência dos microorganismos em porcentagens superiores a 80% após aplicação da quitosana.

Após a biomodificação da dentina com quitosana, foi observada uma redução estatisticamente significativa de *S. mutans* para ambos os métodos de remoção de cárie, enquanto para o *Lactobacillus ssp* houve uma redução apenas para o grupo laser de

Er:YAG. Pasquantonio et al. (2008) observou que as espécies *S. mutans* foram as que apresentaram a mais alta suscetibilidade à quitosana. Outros estudos também mostraram a atividade antimicrobiana da quitosana contra *S. mutans* (Divakar et al., 2018; Mhaske et al., 2018; Chen et al., 2012). Estes resultados podem ser explicados pois tanto o *S. mutans* quanto o *Lactobacillus ssp* são bactérias e possuem a membrana celular circundada por uma parede celular composta por camadas de peptidoglicano à base de N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico e aminoácidos *d* e *l* que se ligam aos grupos amino positivamente carregados da quitosana, os quais expõem a membrana celular bacteriana ao choque osmótico e leva à morte celular (Rajbnia et al., 2016).

A incorporação da quitosana à dentina para melhorar as propriedades mecânicas e a estabilidade biológica também tem sido estudada (Bedran-Russo et al., 2007; Shrestha et al., 2011; Shrestha et al., 2012; Fawzy et al., 2013). Devido aos seus grupos reativos livres e semelhança com o grupo extracelular componentes da matriz, como glicosaminoglicanos (GAGs), a quitosana interage com o colágeno ou com a collagenase mediante ligações intermoleculares entre as unidades carregadas positivamente da quitosana e negativamente do colágeno da dentina (Taravel et al., 1993). Esta interação aumenta a resistência da dentina à degradação hidrolítica (Fawzy et al., 2013) e também a força de adesão dentinária (Shrestha & Kishen, 2012), o que favorece a durabilidade das restaurações (Xu et al., 2011).

Neste estudo, a biomodificação da dentina após a remoção seletiva da lesão de cárie não provocou alterações significativas no comportamento clínico das restaurações após o período de avaliação de um ano. Outros estudos também não encontraram diferenças estatisticamente significativas quando a quitosana foi utilizada para a biomodificação da dentina com relação à microdureza e quantidade de Ca, P e relação Ca/P (Curylofo-Zotti et al., 2017) e molhabilidade da dentina erodida (Ururahy et al., 2017). No entanto, a comparação do nosso estudo com a literatura torna-se difícil, uma vez que não há estudos clínicos longitudinais nos quais observou-se o efeito da quitosana sobre a biomodificação da dentina.

A aplicação da quitosana em cavidades preparadas pelo laser de Er:YAG pode ser considerada uma abordagem terapêutica promissora considerando que devido a sua capacidade de proporcionar estabilidade biológica e resistência da dentina à degradação hidrolítica (Fawzy et al., 2013), poderia minimizar os efeitos adversos da utilização do

laser de Er:YAG, tais como microdisrupturas e desnaturação das fibras colágenas (Sasaki et al., 2002), os quais dificultam a penetração do adesivo nos túblos dentinários (Giachetti et al., 2004; Dunn et al., 2005; Firat et al., 2012) e, conseqüentemente, interferem com a adesão aos materiais restauradores, levando à formação de *gap* e microinfiltração (Kidd, 1976).

Os sistemas adesivos convencionais, empregando a técnica de condicionamento ácido total, apresentam maior susceptibilidade à umidade dentinária (Reis et al., 2007), que pode dificultar a correta infiltração por toda a malha de colágeno desmineralizada, ocasionando os primeiros focos para a degradação da interface de união (Breschi et al., 2008) e maior probabilidade de ocorrência de sensibilidade pós-operatória. Por isso, optou-se pelo emprego do sistema adesivo Single Bond Universal empregando a técnica autocondicionante (Thanaratikul et al., 2016, Muller et al., 2017). Este sistema adesivo apresenta maior estabilidade em meio úmido (Spencer et al., 2000), além da presença do 10-metacriloiloxidecil di-hidrogênio fosfato, conhecido como 10- MDP que possibilita interação química com a estrutura dentinária (Yoshida et al., 2012).

A análise clínica longitudinal utilizando os critérios USPHS modificados (Cvar & Ryge, 2005) realizada neste estudo mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre as restaurações realizadas pelo método convencional e o laser de Er:YAG em molares decíduos após o período de um ano para os critérios cárie secundária e retenção. Este resultado corrobora com achados de estudos clínicos randomizados longitudinais anteriores onde foram avaliados dentes decíduos (Valério et al., 2016) e permanentes (Sarmadi et al., 2018).

Foi observada diferença estatisticamente significativa para as restaurações preparadas com o laser de Er:YAG com relação aos critérios descoloração e adaptação marginal. Este resultado pode ser justificado tendo em vista que o laser de Er:YAG provoca alterações físicas no esmalte dentário que resultam em uma superfície rugosa, composta por poros, à qual proporciona uma ligação micromecânica entre o substrato dentário e os sistemas adesivos (Wen et al., 2010). Malekafzali et al. (2017) observaram uma redução da microinfiltração em cavidades preparadas com o laser de Er:YAG em dentes decíduos quando comparada ao preparo com broca. O laser de Er:YAG aumenta a resistência ácida à desmineralização do esmalte, devido a modificação dos níveis de cálcio e fosfato, conduzindo a formação de componentes mais estáveis e menos solúveis e

sucetíveis aos desafios cariogênicos, prevenindo a ocorrência de cárie secundária (Apel et al., 2004; De Moor & Delme, 2010). Hamidi et al. (2015) verificou após 5 anos de acompanhamento que todas as restaurações realizadas em cavidades preparadas com o laser de Er:YAG apresentaram performance clínica aceitável.

6. CONCLUSÃO

- A remoção seletiva da lesão de cárie promoveu a redução na quantidade de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus ssp* e a biomodificação com gel de quitosana a 2,5% foi efetiva para potencializar o efeito antimicrobiano após ambos os métodos de remoção da lesão de cárie.
- O laser de Er:YAG influenciou a performance clínica das restaurações realizadas apenas nos critérios descoloração e adaptação marginal após o acompanhamento pelo período de um ano.
- O laser Er:YAG e a biomodificação da dentina com quitosana não influenciaram a adaptação marginal das restaurações.

REFERÊNCIAS

- Abreu DM, Leal SC, Frencken JE. Pain experience after conventional, a traumatic, and ultraconservative restorative treatments in 6- to 7-yr-old children. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119:163-168.
- Ana PA, Bachman L, Zezell DM. Lasers effect on enamel for caries prevention. *Laser Phys.* 2006; 16(5):865-875.
- Ando Y, Aoki A, Watanabe H, Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. *Lasers Surg Med.* 1996; 19(2):190-200.
- Aoki A, Ishikawa I, Yamada T, Otsuki M, Watanabe H, Tagami J, Ando Y, Yamamoto H. Comparison between Er:YAG laser and conventional technique for root caries *in vitro*. *J Dent Res.* 1998; 77(6):1404–1414.
- Apel C, Birker L, Meister J, Weiss C, Gutknecht N. The caries-preventive potential of subablative Er:YAG and Er:YSGG laser radiation in an intraoral model: a pilot study. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22(4):312-317.
- Bader C, Krejci I. Indications and limitations of Er:YAG laser applications in dentistry. *Am J Dent.* 2006; 19(3):178-186.
- Banerjee A, Watson TF, Kidd EA. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *Br Dent J.* 2000; 188(9):476-482.
- Banerjee A, Kidd EAM, Watson T. *In vitro* validation of carious dentin removes using diferente excavation criteria. *Am J Dent.* 2003; 16(4):228-230.
- Baraba A, Kqiku L, Gabrić D, Verzak Ž, Hanscho K, Miletić I. Efficacy of removal of cariogenic bacteria and carious dentin by ablation using different modes of Er:YAG lasers. *Braz J Med Biol Res.* 2018; 51(3):68-72.
- Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drumond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensilstrength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 80(1):268–272.
- Beltrame APCA, Suchyta D, Abd Alraheam I, Mohammed A, Schoenfisch M, Walter R, Almeida ICS, Souza LC, Miguez PA. Effect of Phosphorylated Chitosan on Dentin Erosion: An *in vitro* Study. *Caries Res.* 2018; 52(5):378-386.
- Bitello-Firmino L, Soares VK, Damé-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M. Microbial Load After Selective and Complete Caries Removal in Permanent Molars: a Randomized Clinical Trial. *Braz Dent J.* 2018; 29(3):290-29

Bittencourt ST, Pereira JR, Rosa AW, Oliveira KS, Ghizoni JS, Oliveira MT. Mineral content removal after Papacarie application in primary teeth: a quantitative analysis. *J Clin Pediatr Dent*. 2010; 34(3):229-31.

Borges BC, Campos GB, da Silveira AD, Lima KC, Pinheiro IV. Efficacy of a pit and fissure sealant in arresting dentin non-cavitated caries: a 1-year follow-up, randomized single-blind, controlled clinical trial. *Am J Dent*. 2010; 23(6):311-6.

Borges BC, De Souza Bezerra Araújo RF, Dantas RF, De Araújo Lucena A, De Assunção Pinheiro IV. Efficacy of a non-drilling approach to manage non-cavitated dentin occlusal caries in primary molars: a 12-month randomized controlled clinical trial. *Int J Paediatr Dent*. 2012; 22(1):44-51.

Brostek AM, Bochenek AJ, Walsch LJ. Minimally invasive dentistry: a review and update. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2006; 15(3):225–249.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadernaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008; 24(1):90-101.

Bussadori SK, Castro LC, Galvão AC. Papain gel: a new chemo-mechanical caries removal agent. *J Clin Pediatr Dent*. 2006; 30(2):115-9.

Busscher HJ, Engels E, Dijkstra RJB, Mei HCVD. Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth *in vitro*. *Eur J Oral Sci*. 2008; 116(5):493-5.

Camacho-Alonso F, Julián-Belmonte E, Chiva-García F, Martínez-Beneyto Y. Bactericidal Efficacy of Photodynamic Therapy and Chitosan in Root Canals Experimentally Infected with *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study. *Photomed Laser Surg*. 2017; 35(4):184-189.

Ceballo L, Toledano M, Osorio R, Tay FR, Marshall GW. Bonding to Er-YAG-laser-treated dentin. *J Dent Res*. 2002; 81(2):119–22.

Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18(6):553–557.

Chen CY, Chung YC. Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20(6):620-7

Cheng X, Xiang D, He W, Qiu J, Han B, Yu Q, Tian Y. Bactericidal Effect of Er:YAG Laser-Activated Sodium Hypochlorite Irrigation Against Biofilms of *Enterococcus faecalis* Isolate from Canal of Root-Filled Teeth with Periapical Lesions. *Photomed Laser Surg*. 2017; 35(7):386-392.

Costa EM, Silva S, Madureira AR, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK, Pintado MM. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation *in vitro*. Carbohydr Polym. 2014; 101:1081–6.

Costa EM, Silva S, Tavaría FK, Pintado MM. Study of the effects of chitosan upon Streptococcus mutans adherence and biofilm formation. Anaerobe 2013; 20:27–31.

Curylofo-Zotti FA, Tanta GS, Zucoloto ML, Souza-Gabriel AE, Corona SAM. Selective removal of carious lesion with Er:YAG laser followed by dentin biomodification with chitosan. Lasers Med Sci. 2017; 32(7):1595–1603.

Cvar JF, Ryge G. Reprint of criteria for the clinical evaluation of dental restorative materials. Clin Oral Investig. 2005; 9(4):215–232.

Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, Bhagirath AY, Medapati MR, Lai C, Cunha RS. Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An *in vitro* and *in situ* study. J Endod. 2017; 43(8):1332-1336.

De Moor RJ, Delmé KL. Laser-assisted cavity preparation and adhesion to erbium-lased tooth structure: part 2. Present-day adhesion to erbium-lased tooth structure in permanent teeth. J Adhes Dent. 2010; 12(2):91-102.

Dobrindt U, Hacker J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. Curr Opin Microbiol. 2001; 4(5):550–557.

Domisch H, Peus K, Kneist S, Krause F, Braun A, Hedderich J, Jepsen S, Eberhard J. Fluorescence-controlled Er:YAG laser for caries removal in permanent teeth: a randomized clinical trial. Eur J Oral Sci. 2008; 116(2):170–176.

Dos Santos Antonio MP, Moura-Netto C, Camargo SE, Davidowicz H, Marques MM, Maranhão de Moura AA. Bactericidal effects of two parameters of Er:YAG laser intracanal irradiation: ex-vivo study. Lasers Med Sci. 2012; 27(6):1165-1168.

Dunn WJ, Davis JT, Bush AC. Shear bond strength and SEM evaluation of composite bonded to Er:YAG laser-prepared dentin and enamel. J Dent Mater. 2005; 21(7):616–624.

Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. Chitin and chitosan. Chemistry, properties and applications. J Sci Ind Res. 2004; 63(1):20–31.

Divakar DD, Jastaniyah NT, Altamimi HG, Alnakhli YO, Muzahed, Alkheraif AA, Haleem S. Enhanced antimicrobial activity of naturally derived bioactive molecule chitosan conjugated silver nanoparticle against dental implant pathogens. Int J Biol Macromol. 2018; 108:790-797.

Elhennawy K, Finke C, Paris S, Reda S, Jost-Brinkmann PG, Schwendicke F. Selective vs stepwise removal of deep carious lesions in primary molars: 12-months results of a randomized controlled pilot trial. *J Dent*. 2018; 77:72-77.

Ericson D, Kidd E, McComb D, Mjör I, Noack MJ. Minimally invasive dentistry concepts and techniques in cariology. *Oral Health Prev Dent*. 2003; 1(1):59-72.

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.

Finger WJ, Balkenhol M. Rewetting strategies for bonding to dry dentin with an acetone-based adhesive. *J Adhes Dent*. 2000; 2(1):51–56.

Firat E, Gurgan S, Gutknecht N. Microtensile bond strength of an etch-and-rinse adhesive to enamel and dentin after Er:YAG laser pretreatment with different pulse durations. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(1):15–21.

Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. Relationship between hardness, discoloration, and microbial invasion in carious dentin. *J Dent Res*. 1966; 45(4):1033-1046.

Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent*. 1979; 4(2):63-70.

Galafassi D, Scatena C, Galo R, Curylofo-Zotti FA, Corona SAM, Borsatto MC. Clinical evaluation of composite restorations in Er:YAG laser-prepared cavities re-wetting with chlorhexidine. *Clin Oral Invest*. 2017; 21(4):1231–1241.

Giachetti L, Scaminaci Ruso D, Scarpelli F, Vitale M. SEM analysis of dentin treated with the Er:YAG laser: a pilot study of the consequences resulting from laser use on adhesion mechanisms. *J Clin Laser Med Surg*. 2004; 22(1):35-41.

Hamidi MM, Ercan E, Dülgergil CT, Çolak H. Evaluation of the clinical success of class I cavities prepared by an Er:YAG laser—5-year follow-up study. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(7):1895–1901.

Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Nakamura T, et al. Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(3):290–4.

Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram negative bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2001; 71(2-3):235–44.

Hibst RJ. Lasers for caries removal and cavity preparation: state of the art and future directions. *J Oral Laser Appl*. 2002; 2(4):203–211.

Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med.* 1989; 9(4):338–344.

İkinci G, Senel S, Akıncıbay H, Kas S, Ercis S, Wilson CG, Hıncal AA. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Pharm* 2002; 235(1-2):121–127.

Je JY, Kim SK. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(18):6629–33.

Kallis A, Tolidis K, Gerasimou P, Dionysopoulos D. Qualitative evaluation of hybrid layer formation using Er:YAG laser in QSP mode for tooth cavity preparations. *Lasers Med Sci.* 2018; 34(1):23-34.

Kalyoncu IO, Eren-Giray F, Horoglu N, Egil E, Tanboga I. Microleakage of Different Adhesive Systems in Primary Molars Prepared by Er: YAG Laser or bur. *Niger J Clin Pract.* 2018; 21(2):242-247.

Kidd EA. Microleakage: a review. *J Dent.* 1976; 4(5):199–20.

Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Res.* 1993; 27(5):402-8.

Kidd EAM. How clean must a cavity be before restoration? *Caries Res.* 2004; 38(3):305-13.

Keller U, Hibst R, Geurtsen W, *et al.* Erbium:YAG laser application in caries therapy. Evaluation of patient perception and acceptance. *J Dent.* 1998; 26(8):649-56.

Keller U, Hibst R. Effects of Er:YAG Laser in caries treatment: a clinical pilot study. *Lasers Surg Med.* 1997; 20(1):32–38.

Kita T, Ishii K, Yoshinakawa K, Yasuo K, Yamamoto K, Awazu K. In vitro study on selective removal of bovine desmineralized dentin using nanosecond pulsed laser at wavelengths around 5.8 μm for realizing less invasive treatment of dental caries. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(3):961-967

Koutsi V, Noonan RG, Horner JÁ, Simpson MD, Matthews WG, Pashley DH. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. *Pediatr Dent.* 1994; 16(1):29-35.

Kumar ABV, Varadaraj MC, Gowda LR, Tharanathan RN. Characterization of chitooligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemistry Journal* 2005; 391(2):167-75.

Kukidome N, Amagai T, Osuka K, Kato J, Hirai Y, Kato T, Aida S. Bactericidal effects of 2.94 μm and 1.67 μm Laser. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2010; 51(4):185-192.

Li T, Zhang X, Shi H, Ma Z, Lv B, Xie M. Er:YAG laser application in caries removal and cavity preparation in children: a meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2018; 12(77):72-77.

Liu XF, Guan YL, Yang, DZ, Li Z, De Yao K.. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci.* 2001; 79(7):1324–1335.

Lizarelli R, Moriyama L, Jorge J , Bagnato V. Comparative ablation rate from an Er YAG laser on enamel and dentin of primary and permanent teeth. *Laser Phys.* 2006; 16(5):849-58.

Lula EC, Monteiro-Neto V, Alves CM, Ribeiro CC. Microbiological analysis after complete or partial removal of carious dentin in primary teeth: a randomized clinical trial. *Caries Res.* 2009; 43(5):354–358.

Mahapoka E, Arirachakaran P, Watthanaphanit A, Rujiravanit R, Poolthong S. Chitosan whiskers from shrimp shells incorporated into dimethacrylate-based dental resin sealant. *Dent Mater J.* 2012; 31(2):273–9.

Malekafzali B, Asnaashari M, Javadi F. Comparison of marginal microleakage of flowable composite restorations in primary canine teeth prepared with high-speed diamond bur, Er:YAG laser and Er, Cr:YSGG laser. *Laser Ther.* 2017; 26(3):195-202.

Malta DAMP, Kreidler MAM, Villa GE, de Andrade MF, Fontana CR, Lizarelli RFZ. Bond strength of adhesive restorations to Er:YAG laser-treated dentin. *Laser Phys Lett.* 2006; 4(2):153-6.

Maltz M, Garcia R, Jardim JJ, de Paula LM, Yamaguti PM, Moura MS, Garcia F, Nascimento C, Oliveira A, Mestrinho HD. Randomized trial of partial vs. stepwise caries removal: 3-year follow-up. *J Dent Res.* 2012; 91(11):1026–1031.

Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997; 25(6):441–458.

Maskhe SP, Ambiti R, Jagga U, Paul U, Shanmukappa SM, Iska D. Clinicomicrobiological Evaluation of 2% Chitosan Mouthwashes on Dental Plaque. *J Contemp Dent Pract.* 2018; 19(1):94-97.

Massara MI, Alves JB, Brandao PR. A traumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. *Caries Res.* 2002; 36(6):430–436.

- Moosavi H, Ghorbanzadeh S, Ahrari F. Structural and morphological changes in human dentin after ablative and subablative Er:YAG laser irradiation. *J Lasers Med Sci*. 2016; 7(2):86–91.
- Moritz A, Jakolitsch S, Goharkhay K, Schoop U, Kluger W, Mallinger R, Sperr W, Georgopoulos A. Morphologic changes correlating to different sensitivities of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* to Nd:YAG laser irradiation through dentin. *Lasers Surg Med*. 2000; 26(3):250–261.
- Muzzarelli RA, Rochetti R. The determination of molybdenum in sea water by hot graphite atomic absorption spectrometry after concentration on p-aminobenzylcellulose or chitosan. *Analytica Chimica Acta*. 1993; 64(3):371–379.
- Nahas P, Zeinoun T, Namour M, Ayach T, Nammour S. Effect of Er:YAG laser energy densities on thermally affected dentin layer: Morphological study. *Laser Ther*. 2018; 30;27(2):91-97.
- Neves AA, Coutinho E, Cardoso MV, de Munck J, Van Meerbeek B. Micro-tensile bond strength and interfacial characterization of an adhesive bonded to dentin prepared by contemporary caries-excitation techniques. *Dent Mater*. 2011; 27(6):552–562.
- Pasquantonio G, Greco C, Prenna M, Ripa C, Vitali LA, Petrelli D, Di Luca MC, Ripa S. Antibacterial activity anti-biofilm effect of chitosan against strains of *Streptococcus mutans* isolated in dental plaque. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008; 21(4):993-997.
- Pelozo LL, Silva-Neto RD, Corona SAM, Palma-Dibb RG, Souza-Gabriel. Dentin pretreatment with Er:YAG laser and sodium ascorbate to improve the bond strength of glass fiber post. *Lasers Med Sci*. 2018; 34(1):47-54.
- Pestov A, Bratskaya S. Chitosan and Its Derivatives as Highly Efficient Polymer Ligands. *Molecules* 2016; 21(3):330.
- Peters MC, Mclean ME. Minimally invasive operative care. Minimal intervention and concepts for minimally invasive cavity preparations. *J Adhes Dent*. 2001; 3(1):7–16.
- Polizeli SAF, Valério RA, Nemezio MA, Galo R, Rodrigues-Junior AL, Corona SAM. Sensitivity evaluation of caries removal in primary molars using an Er:YAG laser: a randomized split-mouth clinical trial. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 2016; 3(8):116-122.
- Profeta AC, Mannocci F, Foxton RM, Thompson I, Watson TF, Sauro S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin-dentine interface: a microtensile bond strength, scanning electron microscopy, and confocal microscopy study. *Eur J Oral Sci*. 2012; 120(4):353–362.
- Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microb Biotechnol*. 2009; 2(2):186–201.

Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4(6):1457–1465.

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(1):49-53.

Ramos RP, Palma Dibb RG, Chimello DT, Chinelatti MA, Pécora JD. Effect of Er:YAG laser on bond strength to dentin of a self-etching primer and two single-bottle adhesive systems. *Laser Surg Med*. 2002; 31(3):164–170.

Raucci-Neto W, Raquel dos Santos C, Augusto de Lima F, Pécora JD, Bachmann L, Palma-Dibb RG. Thermal effects and morphological aspects of varying Er:YAG laser energy on demineralized dentin removal: an *in vitro* study. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(4):1231-1236.

Reis A, Pellizzaro A, Dal-Bianco K, Gones OM, Patzlaff R, Loguercio AD. Impact of adhesive application to wet and dry dentin on long-term resin-dentin bond strengths. *Oper Dent*. 2007; 32(4):380-7.

Sarmadi R, Andersson EV, Lingström P, Gabre P. A Randomized Controlled Trial Comparing Er:YAG Laser and Rotary Bur in the Excavation of Caries - Patients' Experiences and the Quality of Composite Restoration. *Open Dent J*. 2018; 31(12):443-454.

Sarwar A, Katas H, Zin NM. Antibacterial effects of chitosan–tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight. *J Nanopart Res*. 2014; 16(7):2517–31.

Sasaki KM, Aoki A, Masuno H, Ichinose S, Yamada S, Ishikawa I. Compositional analysis of root cementum and dentin after Er:YAG laser irradiation compared with CO₂ laser and intact roots using Fourier transformed infrared spectroscopy. *J Periodontal Res*. 2002; 37(1):50–59.

Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004; 56(10):1467-80.

Scheffel DLS, Costa CAS, Hebling J, Soares DGS, Basso FG, Ribeiro APD. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater*. 2014; 30(7):769-84.

Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedjelic N, Georgopoulos A, Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Laser Surg Med*. 2004; 35(2):11-116.

- Shirani F, Birang R, Malekipur MR, Zeilabi A, Shahmoradi M, Kazemi S, et al. Adhesion to Er:YAG laser and bur prepared root and crown dentine. *Aust Dent J*. 2012; 57(2):138–43.
- Shrestha A, Friedman S, Kishen A. Photodynamically crosslinked and chitosan-incorporate dentin collagen. *J Dent Res*. 2011; 90(11):1346–1351.
- Shrestha A, Hamblin MR, Kishen A. Characterization of a conjugate between Rose Bengal and chitosan for targeted antibiofilm and tissue stabilization effects as a potential treatment of infected dentin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(9):4876–84.
- Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res*. 2000; 79(7):1458–63.
- Tao S, Li L, Yuan H, Tao S, Cheng Y, He L, Li J. Erbium Laser Technology vs Traditional Drilling for Caries Removal: A Systematic Review with Meta-Analysis. *J Evid Based Dent Pract*. 2017; 17(4):324–334.
- Taravel MN, Domard A. Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interactions with chitosan: I. *Biomaterials* 1993; 14(12):930–8.
- Thanaratikul B, Santiwong B, Harnirattisa C. Self-etch or etch-and-rinse mode did not affect the microshear bond strength of a universal adhesive to primary dentin. *Dent Mater J*. 2016; 35(2): 174–179.
- Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho RM, Tay FR, Pashley DH. Optimizing dentin bond durability: strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer. *Dent Mater*. 2013; 29(10):999–1011.
- Ururahy MS, Curylofo-Zotti FA, Galo R, Nogueira LFB, Ramos AP, Corona SAM. Wettability and surface morphology of eroded dentin treated with chitosan. *Arch Oral Biol*. 2017; 75:68–73.
- Valério RA, Borsatto MC, Serra MC, Polizeli SAF, Nemezio MA, Galo R, Aires CP, dos Santos AC, Corona SAM. Caries removal in deciduous teeth using an Er:YAG laser: a randomized split-mouth clinical trial. *Clin Oral Invest*. 2016; 20(1):65–73.
- Venter JP, Kotze AF, Auzely-Velty R, Rinaudo M. Synthesis and evolution of the moco adhesivity of a CD-chitosan derivative. *Int J Pharm*. 2006; 313(1-2):36–42.
- Wassel MO, Khattab MA. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J Adv Res*. 2017; 8(4):387–392.

Wen X, Liu L, Nie X, Zhang L, Deng M, Chen Y. Effect of pulse Nd:YAG laser on bond strength and microleakage of resin to human dentine. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(6):741-746.

Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bactriol.* 1993; 75(4):299-306.

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(1):150–159.

Yadav P, Chaudhary S, Saxena RK, Talwar S, Yadav S. Evaluation of Antimicrobial and Antifungal efficacy of Chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* biofilm formed on tooth substrate. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9(3):361-7.

Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, Osaka A, Meerbeek BV. Self-assembled nano-layering at the adhesive interface. *J Dent Res.* 2012; 91(4):376-81.

Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs.* 2015; 13(3):1133–1174.

Zakrzewska A, Boorsma A, Brul S, Hellingwerf KJ, Klis FM. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic Cell.* 2005; 4(4):703–715.