UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ISABELLA RODRIGUES ZIOTTI

Biomodificação da dentina desmineralizada com solução de quitosana: Resistência de união, análise química e morfológica da interface adesiva após envelhecimento

Ribeirão Preto
2020

ISABELLA RODRIGUES ZIOTTI

Biomodificação da dentina desmineralizada com solução de quitosana: Resistência de união, análise química e morfológica da interface adesiva após envelhecimento

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências junto ao Programa de Odontologia Restauradora com Área de Concentração em Dentística.

Orientadora: Profa Dra Aline Evangelista Souza Gabriel

Ribeirão Preto
2020

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

Assinatura do autor: _____

Data: ____/____/ 2020.

Ficha Catalográfica

Ziotti, Isabella Rodrigues

Biomodificação da dentina desmineralizada com solução de quitosana: Resistência de união, análise química e morfológica da interface adesiva após envelhecimento. Ribeirão Preto, 2020.

98 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), área de concentração: Odontologia Restauradora-Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Evangelista de Souza Gabriel

1. Dentina. 2. Quitosana. 3. Adesividade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ZIOTTI, I. R. **Biomodificação da dentina desmineralizada com solução de quitosana: Resistência de união, análise química e morfológica da interface adesiva após envelhecimento.** 2020. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Aprovado em:_____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

ISABELLA RODRIGUES ZIOTTI

Nascimento 16/06/1989

Filiação Sidnei Ziotti
Adriana Rodrigues Ziotti

2008 – 2011 Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

2011-2011 Curso de Aperfeiçoamento
Reabilitação Estética
Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas (APCD)

2014 - 2016 Curso de Pós-graduação
Mestrado (Odontologia Restauradora: Dentística)
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, da Universidade de São Paulo, como parte de projeto Auxílio Universal concedido à orientadora (Processo: 425631/2016-8) e bolsa de doutorado do CNPq (Processo: 140395/2016-4).

Dedicatória

À minha mãe, ***Adriana Dandaro Rodrigues,*** minha melhor amiga e confidente. Obrigada por nunca deixar de acreditar em mim, por ser meu exemplo de força e superação, por ser minha companheira e por nunca medir esforços para me ajudar a realizar meus sonhos. Tudo que tenho e sou é por você!

Ao meu pai, ***Sidnei Ziotti,*** por ser exemplo de honestidade e trabalho, por ter me criado com princípios morais, me proporcionar as oportunidades educacionais ao longo da minha caminhada e por todo amor.

À minha irmã, ***Fernanda Rodrigues Ziotti***, minha melhor amiga, meu porto seguro, com quem eu sempre posso contar. A pessoa que vê o melhor de mim, quando nem eu mesma vejo! Você é meu orgulho!

Ao meu irmão, ***Sidnei Ziotti Junior***, exemplo de caráter e perseverança. Aquele que até longe está sempre perto em pensamento e amor. Tenho muito orgulho de suas conquistas. Obrigada por tudo!

Sempre serei grata à Deus por suas vidas. Amo vocês!

Agradecimentos

À ***Deus***, por todos os momentos de felicidade e aprendizado concedidos em minha passagem por esse mundo. Por me mostrar que posso ser mais forte do que imaginava. Eu não teria chegado até aqui sem a ajuda de alguns anjos que Ele me enviou, e sem o amor Dele.

À ***Profa. Dra. Aline Evangelista Souza Gabriel***, minha orientadora, por exercer papel fundamental na minha formação. Agradeço a confiança a mim depositada, toda dedicação e carinho, por toda compreensão nos momentos em que precisei e por incentivar-me a apoiar-me em todos os momentos.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da sua Diretora ***Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva***, e do vice-diretor **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.**

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do ***Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho*.**

Ao Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, ***Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto*.**

À ***Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona***, muito obrigada por todo o conhecimento transmitido ao longo desses anos, desde minha graduação. Você transmite alegria, sempre com um sorriso no rosto e uma palavra amiga.

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do ***Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira***.

À ***Profa. Dra. Yassuko Iamamoto***, docente do Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade e pelo empréstimo de equipamentos, e ao técnico, ***Claudio Roberto Neri***, por toda a ajuda na realização deste trabalho.

À ***Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza***, pessoa doce e inspiradora. Me ensinou na graduação a Odontolgia e hoje, me ensina sobre a vida. Obrigada pelo carinho, confiança em meu trabalho e incentivo!

Aos técnicos de laboratório*,* ***Dra. Débora Fernandes Costa Guedes, Patrícia Marchi e Edson Volta,*** pela ajuda e disponibilidade para a execução deste trabalho.

Ao secretário, ***Carlos Feitosa dos Santos***, pela paciência e carinho que dedica a todos os alunos**,** sempre prestativo, atencioso e sorridente. Obrigada pela ajuda e amizade durante todo o curso.

Aos funcionários, ***Rosângela Angelini, Reginaldo Santana da Silva*****, Fred Augusto Farias** pelo carinho e sorrisos em todos os encontros.

Às secretárias do Departamento de Odontologia Restauradora, ***Maria Amália de Melo Ribeiro*** e ***Maria Izabel Cezário F. Miguel***, por toda a atenção, auxílio e dedicação.

Aos funcionários do Serviço de Pós-graduação, na chefia administrativa do senhor ***Mauro Henrique Leoni Bernardo***, pela atenção e disponibilidade em ajudar.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelas disciplinas ministradas e todos os conhecimentos transmitidos.

Aos queridos, ***Marina Godoy Almeida***, ***Lais Lima Pelozzo, Reinaldo Dias da Silva Neto, Fabiana Curylofo Zotti, Thiago Vinicius Cortez e Larissa Dantas*** pela amizade, palavras de incentivo e pela ajuda! Obrigada por compartilharem o "banco" comigo, onde pudemos dar risadas e sermos confidentes! Sem vocês, tenho certeza que não conseguiria.

Aos amigos da pós-graduação, com os quais dividi divertidos e agradáveis momentos, pela amizade construída, pelas risadas nos momentos de descontração no laboratório e por fazerem parte da minha vida.

Ao meu padrasto, ***Antônio Francisco B. Bernardes***, pelo carinho, paciência, incentivo e por sempre me tratar como filha. Amo você. Obrigada por tudo!

Aos meus, amigos, pelo amor, carinho, paciência e compreensão, mesmo nos momentos de ausência desta etapa de formação acadêmica.

Ao ***CNPq*** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pela bolsa concedida para o meu desenvolvimento e desse projeto.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

Chico Xavier

Resumo

ZIOTTI, I. R. **Biomodificação da dentina desmineralizada com solução de quitosana: Resistência de união, análise química e morfológica da interface adesiva após envelhecimento** – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Este estudo teve o objetivo de avaliar *in vitro* a resistência de união, caracterização química e morfológica da interface adesiva após a biomodificação da dentina desmineralizada com solução de quitosana. A amostra foi composta de 80 molares hígidos (n=10), dos quais 40 receberam indução de cárie pelo método de ciclagem de pH, seguida de simulação da remoção seletiva. Os dentes foram divididos de acordo com o tratamento (biomodificação) da dentina: sem biomodificação (controle) e biomodificação com solução de quitosana 2,5% por 1 min. A superfície foi restaurada com adesivo (Single Bond Universal - 3M) e resina composta (Z250 - 3M). Metade dos dentes de cada grupo foram submetidos ao envelhecimento da interface (6 meses de armazenamento em água + 12000 ciclos térmicos + degradação enzimática) e a outra metade destinada às análises imediatas (24h). Os dentes foram seccionados em palitos (1,0 ± 0,2 mm²) e submetidos à: 1) resistência de união (RU) teste de microtração (MPa); 2) composição química (%) por Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) e 3) Morfologia da interface adesiva em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio (n=5) a fim de analisar o grau de conversão do monômero adesivo por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Os dados de RU foram analisados por ANOVA 3 fatores e, as falhas por Kruskall Wallis e teste de Dunn (α=5%). Os dados do FTIR foram analisados por teste T. Para a RU, verificou-se que a dentina hígida foi superior a desmineralizada (p=0,000), os espécimes biomiodificados foram superiores aos não tratados (p=0,000) e os submetidos à análise imediata apresentaram maiores valores que os envelhecidos (p=0,019). Na interação, a dentina hígida proporcionou maiores valores, tanto para a análise imediata quanto após o envelhecimento (p=0,016) e os espécimes biomodificados apresentaram os maiores valores (p=0,019), também para ambos os momentos de análise. Na análise de falhas, houve diferença (p>0,05) apenas para a dentina hígida tratada com quitosana em relação aos demais grupos, em função da maior incidência de falhas coesivas do material (imediata) e mistas (envelhecidas). Não foram observadas diferenças na concentração dos elementos químicos. Em MEV, observou-se presença de tags e camada híbrida em todos os grupos. Em FTIR, observou-se menores valores do grau de conversão do monômero adesivo após a aplicação da quitosana. Concluiu-se que a biomodificação da dentina com quitosana não interferiu negativamente na composição química e morfológica da interface, porém melhorou a resistência imediata e a longo prazo da interface adesiva, tanto em substrato hígido quanto em desmineralizado. O uso da solução interferiu negativamente no grau de conversão dos monômeros adesivos.

Palavras-chave: Dentina, Quitosana, Adesividade.

Abstract

ZIOTTI, I. R. **Biomodification of demineralized dentin with chitosan solution: Bond strength, chemical and morphological analysis of the adhesive interface after aging** - School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

This study aimed to evaluate, *in vitro,* the bond strength, chemical and morphological characterization of the adhesive interface after the biomodification of demineralized dentin with chitosan solution. The sample was composed of 80 healthy molars (n=10), of which 40 received caries induction by the pH cycling method, followed by simulation of selective removal of caries tissue. The teeth were divided according to the dentin biomodification: without biomodification (control) and biomodification with 2.5% chitosan solution for 1 min. The surface was restored with adhesive (Single Bond Universal - 3M) and composite resin (Z250 - 3M). Half of the specimens in each group were submitted to the aging process (6 months of storage in water + 12,000 thermal cycles + enzymatic degradation) and the other half for immediate analysis (24h). The teeth were sectioned on toothpicks (1.0 ± 0.2 mm²) and subjected to: 1) microtensile bond strength test (μTBS) (MPa); 2) chemical composition (%) by X-ray Dispersive Energy Spectroscopy (EDX) and 3) Morphology of the adhesive interface in Scanning Electron Microscopy (SEM). Potassium bromide tablets (n=5) were made in order to analyze the degree of conversion of the adhesive monomer by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The μTBS data were analyzed by ANOVA 3 factors and the failures by Kruskall Wallis and Dunn's test (α=5%). FTIR data were analyzed by T test. For the μTBS, it was found that the sound dentin was superior to the demineralized dentin (p=0.000), the biomiodified specimens were superior to the untreated (p=0.000) and those submitted to the immediate analysis presented higher values than the aged specimens (p=0.019). In the interaction, the sound dentin provided higher values for the immediate analysis and after aging (p = 0.016) and the biomodified specimens showed the highest values (p=0.019), also for both moments of analysis. In the failure analysis, there was a difference (p> 0.05) for the sound dentin treated with chitosan compared to the other groups, due to the higher incidence of cohesive material (immediate) and mixed (aged) failures. No differences were observed in the concentration of the chemical elements. In SEM, *tags* and a hybrid layer were observed in all groups. In FTIR, lower values of the degree of conversion of the adhesive monomer were observed after the application of chitosan. It was concluded that the dentin biomodification with chitosan did not interfere negatively in the chemical and morphological composition of the adhesive interface, but it improved the immediate and long-term bond strenght of the adhesive interface, in sound and demineralized dentin. The use of the solution negatively affected the degree of conversion of the adhesive monomers.

Keywords: Dentin, Chitosan, Adhesiveness.

Sumário

SUMÁRIO

Introdução.....37

Proposição.....43

Material e Métodos.....47

Resultados 61

Discussão.....71

Conclusão.....81

Referências.....85

Introdução

INTRODUÇÃO

A odontologia minimamente invasiva enfatiza a prevenção e a intervenção precoce na doença cárie com preservação do remanescente e execução de restauração mínima (CALACHE et al., 2013; BROSTEK & WALSH, 2014). O sucesso desta terapia se baseia na seletividade da remoção do tecido cariado (MALTZ et al., 2012; OZ et al., 2019), no qual apenas a dentina infectada ou necrosada precisa ser removida e a dentina afetada ou desmineralizada, da parede de fundo da cavidade pode ser mantida, pois é passível de remineralização, desde que haja adequado selamento (ALVES et al., 2010; BROSTEK & WALSH, 2014; CHEN et al., 2015).

A substância química mais utilizada para o tratamento da dentina afetada por cárie é a clorexidina, devido a sua ação antimicrobiana (BARRIOS et al., 2013), alta substantividade (BARRIOS et al., 2013; EKAMBARAM et al., 2014) e capacidade de inibir as metaloproteinases (CARRILHO et al., 2007; EKAMBARAM et al., 2014; RICCI et al., 2014). Estas enzimas são responsáveis pela degradação das fibras de colágeno expostas (CARRILHO et al., 2007; RICCI et al., 2014) e contribuem para a falha adesiva da interface dente/material restaurador (LIU et al., 2011). No entato, em dentina afetada por cárie, a clorexidina não tem se mostrado capaz de aumentar a resistência da interface adesiva de dentes decíduos e permanentes (LENZI et al., 2012).

A produção de biomateriais a base de quitosana tem sido foco das pesquisas em diversas áreas (PROFETA et al., 2012; ZHANG et al., 2014; CHUNG et al., 2016; HAYASHI et al., 2014; CHEN et al., 2015; CHRONOPOULOU et al., 2016; COVARRUBIAS et al., 2018, ZHOU et al., 2018, CURYLOFO-ZOTTI et a., 2019, GU et al 2019, HUANG et al 2019, STENHAGEN et al 2019). A quitosana é um aminopolissacarídeo formado por unidades de b-2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) obtido da desacetilação da quitina (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2017), um polímero de ocorrência natural encontrado nas paredes celulares dos fungos, leveduras, insetos e principalmente nas carapaças dos crustáceos (camarão, lagosta e caranguejo) (RODRIGUES et al., 2005; KURITA, 2006). Quimicamente, a molécula de quitosana apresenta versatilidade em relação a reações de substituição devido a presença do grupo amino, o qual a torna interessante do ponto de vista reativo (RODRIGUES et al., 2005; KONG et al., 2010). Devido a ação antimicrobiana (RABEA et al., 2003; ELSAKA & ELNAGHY,

2012) e capacidade quelante (RABEA et al., 2003; SILVA et al., 2012), a solução de quitosana tem sido testada para a remoção da camada de *smear* após o preparo do canal radicular, substituindo o EDTA (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2013, MAZZI-CHAVES et al., 2019), e também na atividade antibacteriana do biofilme dental (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2017).

Persadmehr e colaboradores (2014), em um estudo utilizando colágeno extraído da cauda de ratos, verificaram que a quitosana reduz significantemente a ação das metaloproteinases, efeito similar ao da clorexidina. No entanto, a quitosana possui vantagem de ser biocompatível, biodegradável, atóxica e bioadesiva (RABEA et al., 2003; KURITA, 2006, KONG et al., 2010), além de ajudar no processo de remineralização de superfícies desmineralizadas, por meio da deposição de íons cálcio e fosfato (CURYLOFO-ZOTTI et al., 2017), o que torna interessante o seu uso na Odontologia Restauradora (SHRESTHA et al., 2014). A bioadesividade dessa substância se dá por meio de ligação eletrostática, na qual o grupo amina da quitosana (NH_3^+) é atraído pelo grupo carboxila do colágeno (COO^-) (RODRIGUES et al., 2005), o que poderia aumentar mecânica e quimicamente a estabilidade da matriz orgânica e, dessa forma, protegê-la contra a degradação (PERSADMEHR et al., 2014; SHRESTHA et al., 2014). Recentemente, autores reportaram que as nanoparticulas de quitosana possuem propriedades de adesão a estrutura dental (CHRONOPOULOU et al., 2016).

Deve-se ressaltar que a obtenção de interface bioadesiva em substrato parcialmente desmineralizado exige cuidados, pois a dentina afetada por cárie apresenta matriz orgânica desorganizada e com características morfológicas diferentes da dentina hígida (ERHARDT et al., 2008, PERDIGÃO, 2010). Além disso, as metaloproteinases presentes na dentina são ativadas pelos subprodutos das bactérias do processo carioso (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006, VIDAL et al., 2014) e, juntamente com a absorção hidrolítica, degradam mais rapidamente a interface adesiva (LIU et al., 2011; KATO et el., 2012).

A degradação da interface adesiva está diretamente relacionada com as propriedades químico-mecânicas dos polímeros resinosos que infiltram na dentina (HASHIMOTO et al., 2006; EKAMBARAM et al., 2014). A polimerização incompleta dos monômeros do adesivo ocasiona descoloração marginal, cárie secundária e sensibilidade pós-operatória (FERRACANE & GREENER, 1986; YUAN et al., 2007). Após a fotopolimerização, o grau de conversão dos sistemas adesivos varia de 55%

a 75% (STANSBURY & DICKENS, 2001), no entanto, a reação de polimerização nunca é completa e o polímero resultante dessa reação ainda possui inúmeras ligações duplas que não reagiram (HOLMES et al., 2007).

A quantidade de monômeros convertidos após a polimerização é um potencial indicador de desempenho clínico das restaurações (HOLMES et al., 2007), porém, sabe-se que quanto maior o grau de conversão de monômeros em polímeros, maior será a contração de polimerização inicial do material resinoso (ALEIXO et al., 2014), podendo ocasionar falhas no selamento marginal e comprometer a resistência de união. É importante ressaltar que, quando utilizado um agente biomodificador do substrato dentinário, é necessário que ele não interfira negativamente no grau de conversão do sistema adesivo.

Com o intuito de aprimorar a interface adesiva, estudos avaliaram o efeito do tratamento da dentina com quitosana após o condicionamento com ácido fosfórico e verificaram aumento da força de adesão imediata (FAWZY et al., 2013) e melhora na infiltração do adesivo na dentina hígida (DAOOD et al., 2013). No entanto, ambos estudos *in vitro* (DAOOD et al., 2013; FAWZY et al., 2013) utilizaram a quitosana associada a riboflavina, seguida da ativação com sistema UVA, portanto, é difícil saber o quanto desses resultados podem ser atribuídos a utilização isolada da quitosana.

A proposta de biomodificação da dentina com agente inibidor de metaloproteinases tem sido estudada, porém os resultados ainda são controversos (LENZI et al.,2012; FAWZY et al., 2013; DAOOD et al., 2013; EKAMBARAM et al., 2014; MANSO et el., 2014, RICCI et al., 2014; CHEN et al., 2015; CURYLOFO-ZOTTI et al., 2019; PINI et al., 2020). A adesão em superfície desmineralizada e seca causa colapso das fibras, deixa áreas da dentina com colágeno exposto e desprotegido e interfere negativamente na infiltração dos monômeros resinosos (HASHIMOTO et al., 2006).

Dessa forma, considerando que a remoção seletiva do tecido cariado é uma realidade na prática clínica, torna-se relevante analisar *in vitro* a possibilidade de biomodificar a dentina desmineralizada com solução de quitosana, e melhorar a estabilidade estrutural da matriz colágena. A incorporação desse biopolímero na dentina desmineralizada poderia aumentar a resistência mecânica e reduzir o tempo de degradação da interface adesiva.

Proposição

OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo geral avaliar o tratamento da dentina hígida e desmineralizada com solução de quitosana a 2,5% na estabilidade mecânica e caracterização química e morfológica da interface dentina/material restaurador, sendo avaliado (a):

1. Resistência adesiva da interface dentina/material restaurador por meio de teste de microtração e posterior análise de falha, por meio de lupa estereoscópica.
2. Composição química da interface adesiva por meio de Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)
3. Morfologia da interface adesiva em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
4. Grau de conversão do monômero adesivo por meio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Material e Método

MATERIAL E MÉTODO

Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e foram conduzidos de acordo com as regulamentações sobre pesquisas com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (Resolução n°466 de 12/12/2012).

Delineamento experimental

O estudo foi realizado de modo aleatorizado e a amostra foi composta de 80 molares, hígidos (n=10), dos quais 40 receberam indução de lesão de cárie pelo método de ciclagem de pH (8h em solução desmineralizante e 16h em solução remineralizante) (MARQUEZAN et al., 2009). Os fatores em estudo serão: 1) o *substrato dental*, em 2 níveis: dentina desmineralizada e dentina hígida; 2) a *biomodificação da dentina*, em 2 níveis: sem biomodificação (controle) e biomodificada com solução de quitosana 2,5% e 3) o *envelhecimento da interface adesiva*, em 2 níveis: sem envelhecimento (testes realizados após 24h) e com envelhecimento (testes realizados após 6 meses de armazenamento em água + 12000 ciclos térmicos + degradação enzimática).

As variáveis de resposta foram: 1) Resistência de união da interface dentina/material restaurador por meio de teste de microtração (MPa) e posterior análise de falha em lupa estereoscópica; 2) Composição química (%) da interface adesiva por EDS; 3) Morfologia da interface adesiva em MEV e 4) Grau de conversão do monômero adesivo por meio de FTIR.

Seleção da amostra

Foram selecionados 80 molares humanos hígidos (Figura 1), recém-extraídos, provenientes do Biobanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (Registro CONEP B-002).

Os dentes permaneceram imersos em solução de timol 0,1% a 4°C até a utilização (RICCI et al., 2014, MANSO et al., 2014), quando então, foram lavados em água corrente por 24 horas para eliminação dos resíduos de timol. Em seguida, foram analisados por meio de lupa estereoscópica (Nikon, Melville, NY, EUA) a fim de comprovar a ausência de defeitos estruturais.

Quarenta dentes receberam indução de lesão de cárie pelo método de ciclagem de pH. Tal método consiste em isolar as superfícies de esmalte com cera a fim de que apenas a dentina da superfície oclusal permaneça exposta. Cada dente foi imerso em 10 mL de solução desmineralizante durante 8 horas, seguida de 10 mL de solução remineralizante por 16 horas, durante 14 dias, a temperatura ambiente (MARQUEZAN et al., 2009).

Figura 1. Molares humanos hígidos.

Preparo da amostra

Os molares tiveram o esmalte oclusal removido por meio de um disco diamantado acoplado em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) a aproximadamente 2 mm abaixo da junção amelodentinária. A superfície foi inspecionada com microscópio óptico para garantir que todo o esmalte foi removido e atingiu-se a profundidade desejada. A fim de padronizar a camada de *smear*, poliu-se superfície com lixa de carbeto de silício (SiC) com granulação #600 (Hermes Abrasives Ltda, Virginia Beach, VA, EUA) em politriz refrigerada (Arotec, Cotia, SP, Brasil) por 30 segundos.

Nos dentes que receberam indução de lesão de cárie pelo método de ciclagem de pH (8h em solução desmineralizante e 16h em solução remineralizante), a superfície oclusal foi removida da mesma maneira descrita anteriormente (SPENCER et al., 2005). A simulação da remoção do tecido cariado foi realizada de modo seletivo, ou seja, a dentina cariada foi completamente removida e mantida a

dentina afetada na parede pulpar, endurecida e resistente à curetagem, passível de remineralização (MALTZ et al., 2012).

Foram empregadas brocas esféricas carbide (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) em contra-ângulo acoplado à micromotor de baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) compatíveis com o tamanho da lesão de cárie e curetas (Duflex SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A verificação da simulação da remoção seletiva da lesão de cárie foi realizada de acordo com critérios clínicos de dureza, empregando curetas (MALTZ et al., 2007).

Os dentes tiveram as raízes seccionadas transversalmente em 1 mm abaixo da junção cemento-esmalte utilizando disco diamantado montado em máquina de corte (Isomet 1000; Buehler Ltda, Lake Bluff, Il, EUA) sob refrigeração. A porção correspondente à câmara pulpar foi preenchida com resina composta (Filtek Z250; 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA).

Divisão dos grupos experimentais

Os 40 espécimes de dentina hígida e os 40 de dentina desmineralizada foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de acordo com a *biomodificação da dentina*: sem biomodificação (controle) e biomodificação com solução de quitosana a 2,5%. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos (n=10) de acordo com o *envelhecimento da interface adesiva*: sem envelhecimento e com envelhecimento (6 meses de armazenamento em água + 12000 ciclos térmicos + degradação enzimática).

Preparo da solução de quitosana a 2,5%

Foram pesadas 20 gramas de quitosana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) de baixo peso molecular (75-85% de desacetilação) (CHUNG et al., 2016) 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). A fim de evitar a agregação das partículas e elevar o pH da solução, foi adicionado 1 mol/L de solução NaOH (DAOOD et al., 2013; FAWZY et al., 2013) A solução foi aviada no Laboratório de Pesquisas em Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP-USP.

Procedimento restaurador

Em metade dos espécimes de cada grupo (dentina hígida ou desmineralizada) foi realizado o procedimento de biomodificação da dentina com a solução de quitosana a 2,5% (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2013). Para tal, a dentina foi irrigada com 1 mL da solução, de forma ativa na superfície por 1 min (SILVA et al., 2013), seguida por secagem com papel absorvente. Na outra metade dos espécimes, este procedimento não foi realizado.

De acordo com as normas do fabricante, aplicou-se uma camada do adesivo (Adper Single Bond Universal, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) de forma ativa com posterior evaporação do solvente e fotopolimerização por 10 segundos.

As superfícies de dentina foram restauradas com resina composta Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), incluída em 2 incrementos de 2 mm com auxílio de espátula nº 1 (Duflex SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e fotopolimerizada mediante aplicação de luz LED (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 20s em cada incremento, mantendo-se a extremidade do aparelho à distância de 1 cm da superfície da resina, com auxílio de dispositivo próprio. Os materiais utilizados e o procedimento restaurador estão demonstrados nas Figuras 2 e 3.

Figura 2. Materiais utilizados durante o procedimento restaurador: (A) Quitosana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA); (B) Adesivo (Adper Single Bond Universal, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA); (C) Resina Composta (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA).

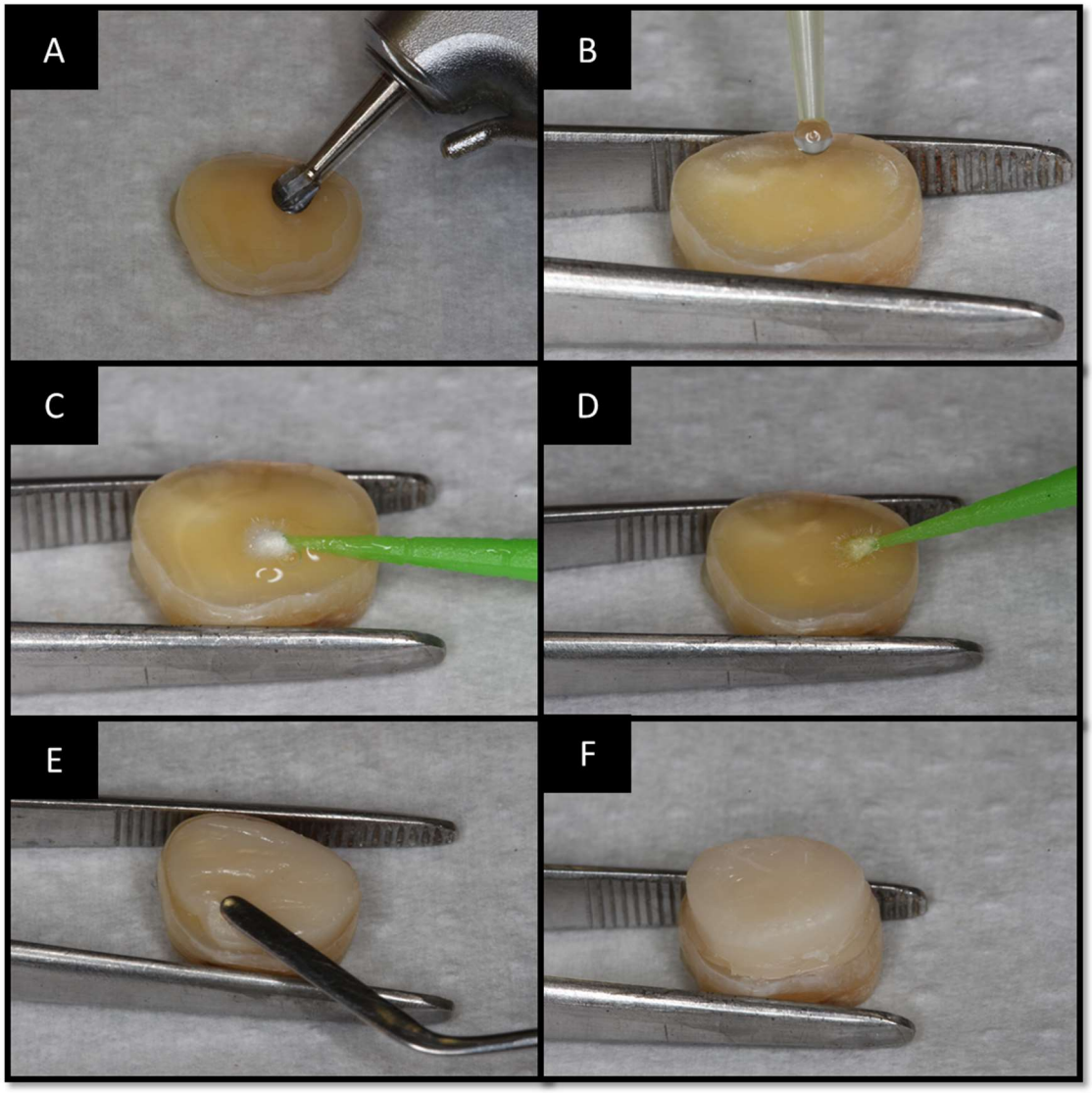

Figura 3. Procedimento restaurador: (A) Remoção da dentina cariada; (B) Biomodificação da superficie com solução de quitosana; (C) Aplicação da solução de quitosana de forma ativa por 1 minuto; (D) Aplicação do sistema adesivo; (E) Inserção da resina composta; (F) Aspecto final da restauração.

Secção dos espécimes

Metade dos espécimes de cada grupo (conjunto dentina/restauração) foram destinados às análises imediatas. Dessa forma, foram armazenados em água destilada a 37°C por 24h e, na sequência, seccionados com irrigação constante no sentido ocluso-pulpar em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Descartou-se as extremidades da restauração e foram obtidos no mínimo 5 palitos de 1,0 ± 0,2 mm² de área transversal, extraídos da porção central do espécime (PROFETA et al., 2012). A espessura dos palitos foi confirmada com paquímetro digital (Mitutoyo, Toquio, Japão). Quatro palitos foram destinados ao

teste de resistência adesiva (n=10 dentes e 40 palitos por grupo), e o outro às análises em EDS e MEV (n=4 dentes e 4 palitos por grupo).

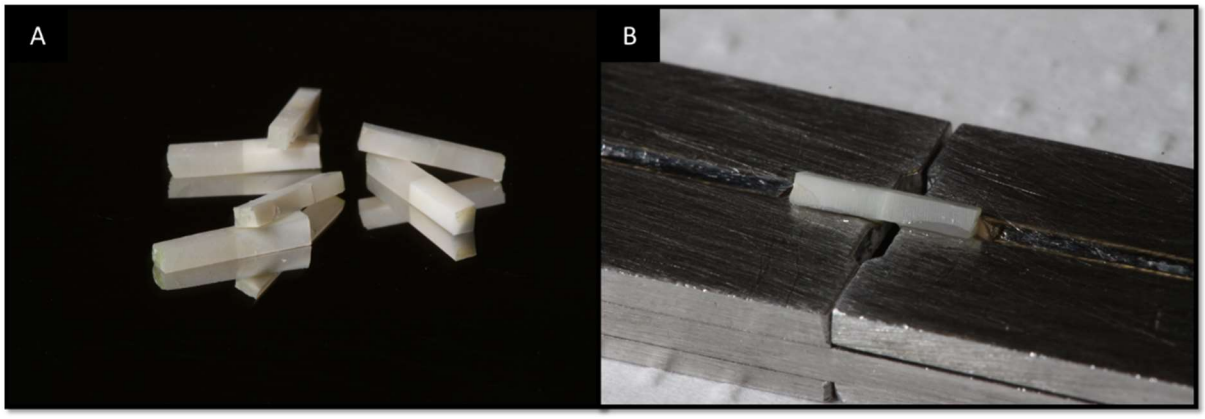

Figura 4. Teste de Microtração: (A) Palitos seccionados; (B) Palito fixado no dispositivo de aço inoxidável.

Envelhecimento da interface adesiva

A outra metade dos espécimes foi destinada às análises pós-envelhecimento da interface. O conjunto dente/restauração foi envelhecido antes da secção dos palitos e esse processo foi realizado com a combinação dos protocolos de degradação hidrolítica (PROFETA et al., 2012; BORSATTO et al., 2013), térmica (BORSATTO et al., 2013) e enzimática (TOLEDANO et al., 2007; KATO et al., 2012).

Para o envelhecimento hidrolítico da interface, os espécimes foram armazenados em 20 mL água destilada a 37°C em estufa por 6 meses, com troca da água semanalmente (PROFETA et al., 2012). O envelhecimento térmico foi constituido de banhos de água, entre 5°C e 55°C, em máquina de termociclagem (Ética Equip. Científicos S/A, São Paulo, SP, Brasil), com tempo de espera de 30 s e tempo de transferência de 3 s entre cada banho. Foram 500 ciclos térmicos por semana, totalizando 12000 ciclos (BORSATTO et al., 2013).

Após os 6 meses de armazenamento em água e ciclagem térmica, os espécimes foram submetidos à degradação enzimática da interface. Para tal, foram imersos em saliva artificial (20 mmol / L HEPES, 0,70 mmol / L de $CaCl_2$, 0,20 mmol / L de $MgCl_2.6H_2O$, 4 mmol / l KH_2PO_4, 30 mol / L de KCl, 0,30 mmol / L de NaN_3), contendo um coquetel de inibidor de protease isento de EDTA (Complete™ inibidor de protease Cocktail, Roche) a uma concentração de 100 U / mL, com adição de colagenase de *Clostridium histolyticum* (100 U/mL) (Sigma-

Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) durante 5 dias a 37°C (GANSS et al ., 2004). Após esse período, foram lavados com água destilada, secos e seccionados em palitos do mesmo modo descrito na análise imediata.

Teste de resistência de união à microtração

Os espécimes foram posicionados na máquina universal de ensaios (Instron Corporation, Canton-Massachusetts, EUA) com célula de carga de 50Kg/f, fixados em dispositivo de aço inoxidável com adesivo cianoacrílico (Super Bonder; Henkel Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e submetidos a força de tração com velocidade de 0,5 mm/min até a falha (Figura 5). Os valores de resistência de união foram expressos em megapascal (MPa), fornecidos pelo programa por meio do cálculo das secções transversais dos palitos, medidas previamente ao teste.

As superfícies envolvidas na fratura de cada espécime foram analisadas em lupa estereoscópica (Nikon, Melville, NY, EUA) para classificação quanto ao padrão de fratura, em adesiva, quando a superfície dentinária estivesse coberta por fina camada de material adesivo; coesiva do material, quando a superfície estivesse coberta por resina composta; coesiva do substrato, quando a falha ocorrer na dentina; e mista, nas situações em que houver a combinação dos tipos adesiva e coesiva.

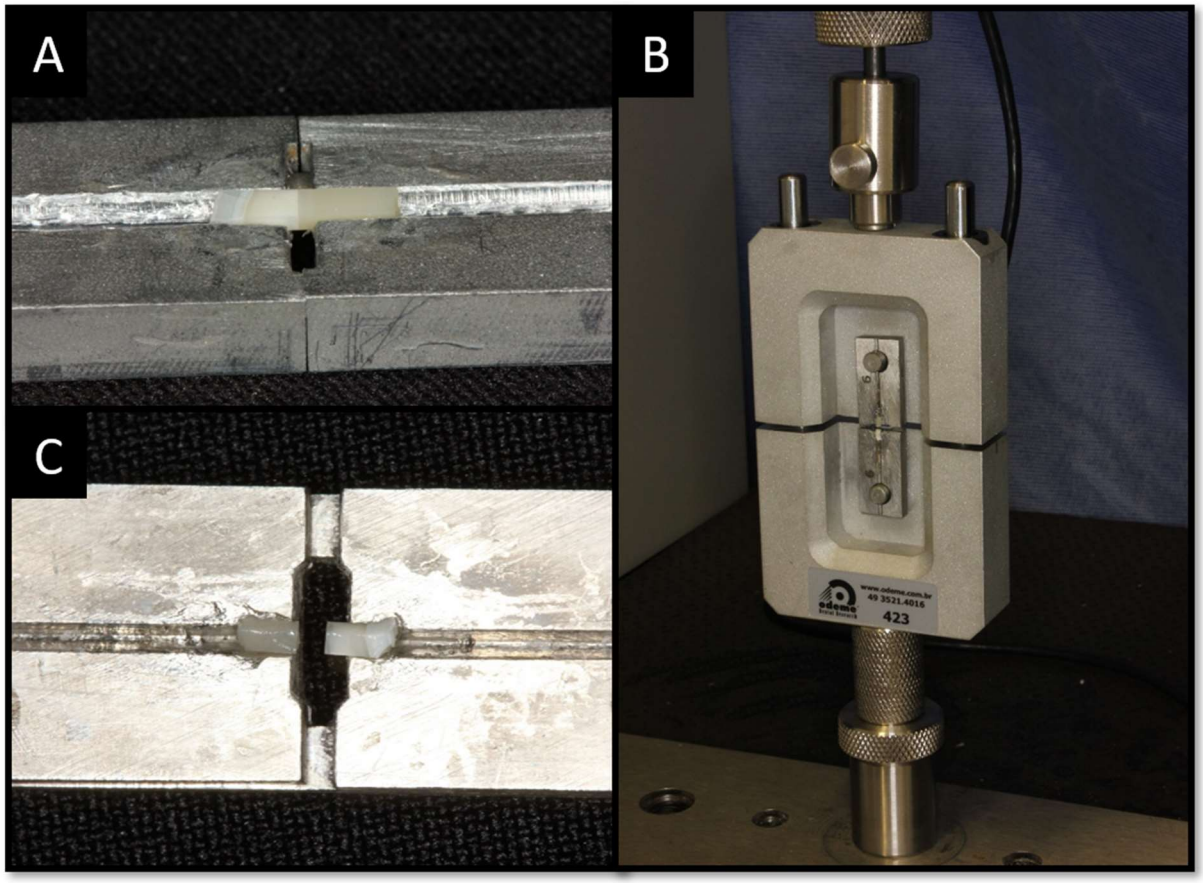

Figura 5. Teste de resistência de união por Microtração: (A) Palito posicionado em dispositivo de aço inoxidável; (B) Dispositivo acoplado à máquina durante a realização do ensaio; (C) Palito fraturado após o ensaio.

Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interface

A leitura por meio de EDS se baseia na emissão de energia proveniente de átomos e íons excitados para identificação e quantificação dos elementos químicos presentes em uma amostra.

Os palitos de cada dente destinados às análises em EDS e MEV foram fixos em anéis de resina acrílica e tiveram a interface adesiva de uma das faces polida com lixa d'água de granulação decrescente (#600 e 1200) e pano de polimento úmido em fibra sintética (Bueher, São Paulo, SP, Brasil) com pastas de alumina de granulação de 0,3 μm e 0,05μm (Bueher, São Paulo, SP, Brasil).

Após serem lavados e secos, foram fixados em *stubs* com fita dupla-face de carbono e levados ao Microscópio Eletrônico de Varredura com detector de Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) acoplado (EVO 50; Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra) pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica

de Varredura do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Ribeirão Preto, SP. Realizou-se a visualização de toda área sob MEV a uma ampliação de 100x, a fim de determinar as percentagens dos elementos químicos predominantes na interface (%).

Na sequência, os espécimes foram desidratados em etanol de 25°, 50°, 75°, 95° GL, mediante imersão por 20 minutos em cada solução, seguida da imersão, por 1 hora, em etanol 100° GL. Após a secagem dos espécimes com papel absorvente, eles foram imersos em hexametildisilazano (HDMS – Merck KgaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos, em capela, conforme demonstrado na Figura 6. Finalizada a desidratação, foram fixados novamente em *stubs* metálicos e cobertos com fina camada da liga ouro-paladium em aparelho de metalização a vácuo (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein).

Realizou-se a varredura de toda a interface adesiva e, em seguida, foi fotografada a área mais representativa de cada grupo em diferentes aumentos. Observou-se a presença e uniformidade da camada híbrida, os *tags* e possíveis *gaps* na interface adesiva da dentina hígida e desmineralizada, submetidas ao tratamento com solução de quitosana (com e sem degradação). As fotomicrografias foram analisadas por 2 examinadores cegos quanto aos grupos experimentais e previamente calibrados (Kappa > 0,9).

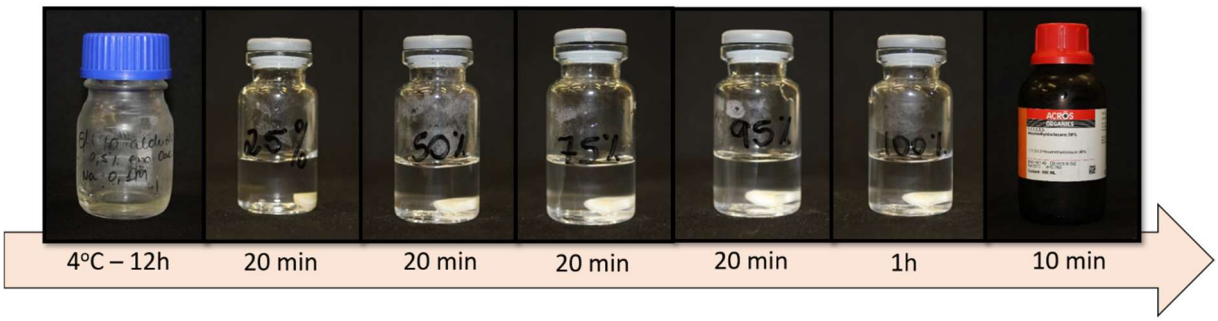

Figura 6. Desenho esquemático do protocolo de desidratação dos espécimes para posterior análise em MEV.

Grau de Conversão do sistema adesivo

A análise em Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) fornece informações da distribuição espectral do adesivo, colágeno e mineral na interface adesiva (CHUNG et al., 2016), além disso, permite o cálculo do grau de

conversão monomérico do material adesivo (SPENCER et al., 2005; ALEIXO et al., 2014).

O grau de conversão do sistema adesivo foi aferido por meio de FTIR (IRPrestige-21, Shimadzu, Tokio, Japão), pertencente à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Departamento de Química, pelo qual foram realizadas as leituras em modo absorbância do sistema adesivo, previamente e posteriormente à fotopolimerização. Para tanto, foram confeccionadas pastilhas de Brometo de Potássio (KBr), adicionando-se 100mg de Brometo de potássio em um dispositivo de aglutinação pressionados por uma prensa hidráulica, com uma carga de 10 toneladas durante 1 minuto, a fim de obter-se as pastilhas.

Para aferir o grau de conversão, gotejou-se uma gota da solução ao centro da pastilha de KBr, que foi espalhada com auxílio de aplicador microbrush, seguido da obtenção dos espectros do adesivo não polimerizado. Em seguida, o adesivo foi fotopolimerizado por 10 segundos, de acordo com a instrução do fabricante e novos espectros foram obtidos (Figura 7). As amostras foram analisadas utilizando-se um acessório de refletância difuso e as medidas de absorbância avaliadas por meio do *software* Origin 8.0 (Microcal Origin 8.0; OriginLab, Northampton, MA, EUA), nas seguintes condições experimentais: resolução de 2,0 cm^{-1} sobre a região espectral de 4000-400 cm^{-1} e com 20 varreduras de cada espectro.

Para o cálculo de conversão do sistema adesivo associado ao uso prévio da solução de quitosana, gotejou-se uma gota da solução ao centro da pastilha de KBr, espalhando-a com auxílio de aplicador microbrush, seguida do gotejamento do sistema adesivo, como descrito anteriormente.

O grau de conversão foi determinado pelo número de ligações duplas de carbono que são convertidas em uma única ligação de acordo com a seguinte fórmula:

$$\mathrm{DC}\ (\%) = 1 - \frac{\left(1637\mathrm{cm}^{-1}/1610\mathrm{cm}^{-1}\right)\ \text{polimerizado}}{\left(1637\mathrm{cm}^{-1}/1610\mathrm{cm}^{-1}\right)\ \text{não polimerizado}}$$

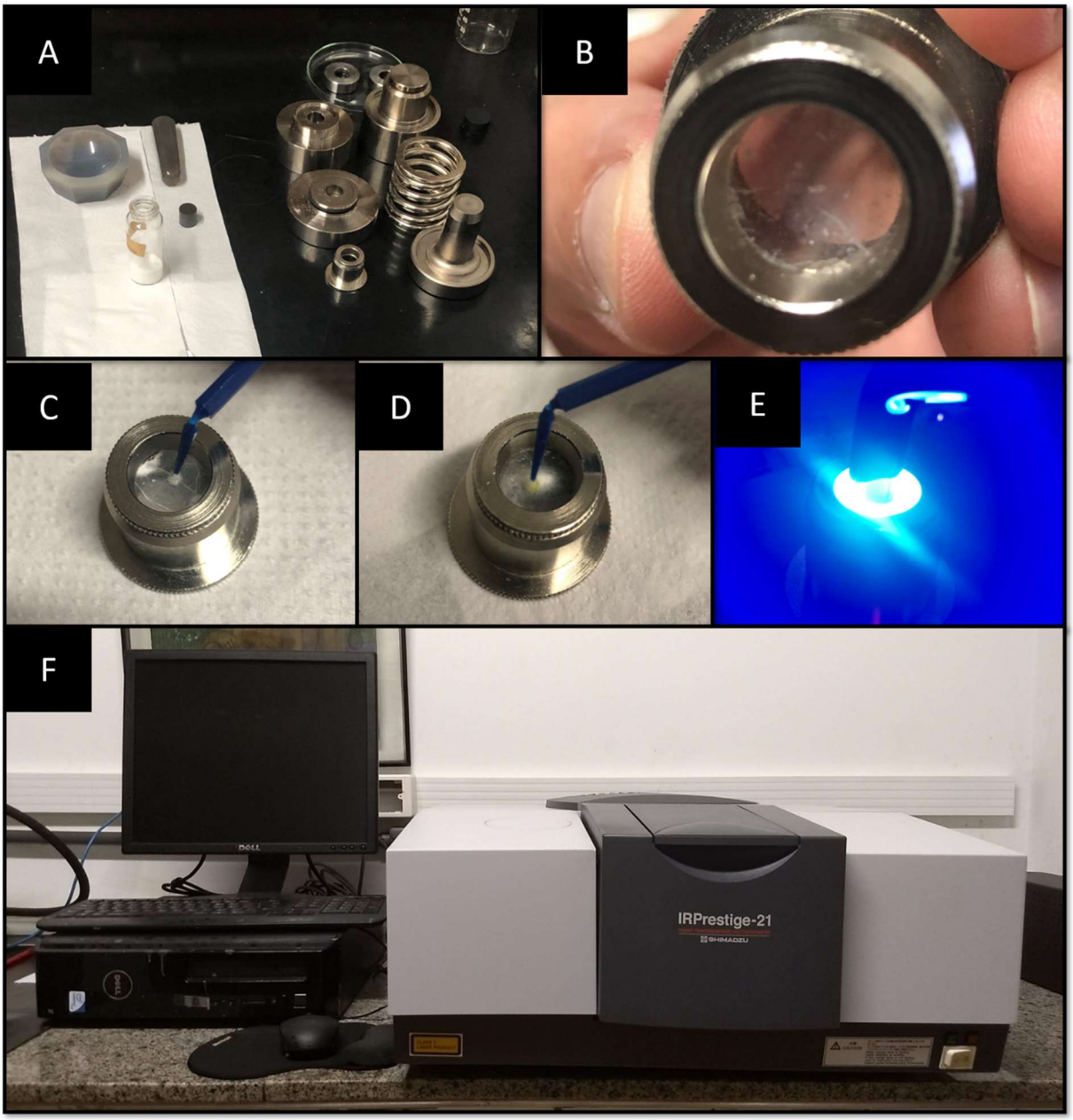

Figura 7. Análise do grau de conversão dos monômeros adesivos: (A) Materiais utilizados para a confecção das pastilhas de brometo de potássio; (B) Pastilha de brometo de potássio pronta; (C) Aplicação da solução de quitosana a 2,5%; (D) Aplicação do sistema adesivo; (E) Fotopolimerização do sistema adesivo; (F) Aparelho utilizado para a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Análise dos dados

Os resultados obtidos foram avaliados por meio do *software* SPSS (versão 25 para Windows; SPSS Inc, Chicago, IL, EUA) com nível de significância de 5% para todas as análises.

A média da resistência de união obtida de 4 palitos de cada dente foi usada para representar o μTBS, produzindo 40 valores por subgrupo para análise. O teste

de Shapiro-Wilk averiguou a distribuição normal da amostra e a Análise de Variância a 3 fatores foi feita, considerando-se: *substrato dentinário* (hígido ou desmineralizado), *biomodificação da dentina* (com e sem quitosana) e *envelhecimento da interface* (imediato e após 6 meses) como fatores independentes (fatorial 2 x 2 x 2). Para análise do padrão de falha, foi empregado o teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis e pós-teste de Dunn.

Os valores obtidos pelo EDS foram expressos em porcentagem e os dados do FTIR foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk, seguido pelo Teste T.

A análise das fotomicrografias obtidas em MEV foi realizada por 2 examinadores calibrados (kappa intraexaminador A= 0,92, Kappa intraexaminador B= 0,98, kappa interexaminador AB = 0,87).

Resultados

Resistência de união (teste de microtração)

A Tabela 1 contém os valores médios de resistência de união e os desvios-padrões, em MPa, dos grupos experimentais. Foram destinados a esse ensaio 4 palitos por dente, e os valores médios de resistência de união foram calculados por dente (n=10).

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrões, em MPa, da resistência de união (μTBS) do material adesivo à dentina, nos grupos experimentais.

	Sem solução de quitosana 2,5%		Com solução quitosana 2,5%	
	Imediata	Envelhecida*	Imediata	Envelhecida*
Dentina hígida	27,34 ± 4,33	32,20 ± 5,85	38,47 ± 8,21	33,39 ± 9,92
Dentina desmineralizada	13,54 ± 4,28	9,74 ± 4,90	24,65 ± 9,54	13,93 ± 5,34

**6 meses de armazenamento em água + 12000 ciclos térmicos + degradação enzimática*

A análise de variância mostrou diferença estatisticamente significante para os 3 fatores analisados: o *substrato* (p=0,000), a *biomodificação* dentinária (p=0,000) e o *envelhecimento* da interface adesiva (p=0,019).

Os espécimes de dentina hígida tiveram valores de resistência de união superiores aos de dentina desmineralizada. Os espécimes que receberam a biomodificação com quitosana a 2,5% tiveram os maiores valores de resistência de união, diferentes dos sem biomodificação. Os espécimes da análise imediata apresentaram valores estatisticamente superiores aos envelhecidos.

No que diz respeito às interações, verificou-se ausência de diferença estatisticamente significante para *substrato* x *biomodificação* (p=0,947), e *substrato* x *biomodificação* x *envelhecimento* (p=0,940).

Quando se comparou o *substrato x envelhecimento*, pode-se observar que os espécimes de dentina hígida apresentaram os maiores valores de resistência de união tanto para a análise imediata quanto após a realização do protocolo de envelhecimento (p = 0,016), como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios e desvios-padrões, em MPa, da resistência de união do material adesivo à dentina, considerando-se o substrato (hígido ou desmineralizado) e o momento da análise (imediato ou após envelhecimento dos espécimes).

	Dentina hígida	Dentina desmineralizada
Análise imediata	(32,90 ± 8,57) Aa	(19,09 ± 9,18) Bb
Após envelhecimento *	(32,99 ± 7,34) Aa	(11,83 ± 5,43) Bb

**6 meses de armazenamento em água + 12000 ciclos térmicos + degradação enzimática*
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante dentro da mesma coluna (p<0,05)
Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante dentro da mesma linha (p<0,05)

Quando se analisou a interação *biomodificação x envelhecimento*, verificou-se que os espécimes tratados com solução de quitosana a 2,5% apresentaram os maiores valores de resistência de união (p = 0,019) para ambos os momentos de análise (imediato e após o envelhecimento da interface), como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios e desvios-padrões, em MPa, da resistência de união do material adesivo à dentina, considerando-se a biomodificação da dentina (com e sem) e o momento da análise (imediato ou após envelhecimento dos espécimes).

	Sem quitosana 2,5%	Com quitosana 2,5%
Análise imediata	(20,44 ± 8,22) Ab	(31,56 ± 11,19) Aa
Após envelhecimento *	(20,72 ± 11,94) Aa	(24,40 ± 12,96) Aa

**6 meses de armazenamento em água + 12000 ciclos térmicos + degradação enzimática*
Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante dentro da mesma coluna (p<0,05)
Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante dentro da mesma linha (p<0,05)

Análise do padrão de falha pós-teste

O padrão de falha de cada grupo experimental foi expresso em frequência de distribuição e analisado estatisticamente por testes não paramétricos (p>0,05). As Tabelas 4 e 5 e Figuras 8 e 9 ilustram os resultados. Houve predomínio de falhas adesivas em todos os grupos.

Tabela 4. Frequência de distribuição dos *scores* atribuídos aos padrões de falha, nos espécimes destinados à análise imediata de resistência de união (n= 40).

	Dentina hígida		Dentina desmineralizada	
	Sem quitosana	Com quitosana	Sem quitosana	Com quitosana
Adesiva	36/40	18/40	32/40	28/40
Coesiva Substrato	4/40	6/40	0/40	6/40
Coesiva Material	0/40	12/40	0/40	0/40
Mista	0/40	4/40	8/40	6/40
Mediana	1	2	1	1
	a	*b*	*a*	*a*

**Letras minúsculas diferentes ao final de cada coluna indicam diferença estatisticamente significante (Testes Kruskall-Walis e Dunn, p=0,01).*

Na análise imediata, observou-se diferença significante (p> 0,05) apenas para os espécimes de dentina hígida previamente tratados com solução de quitosana a 2,5% em relação aos demais grupos, em função da maior incidência de falhas coesivas do material.

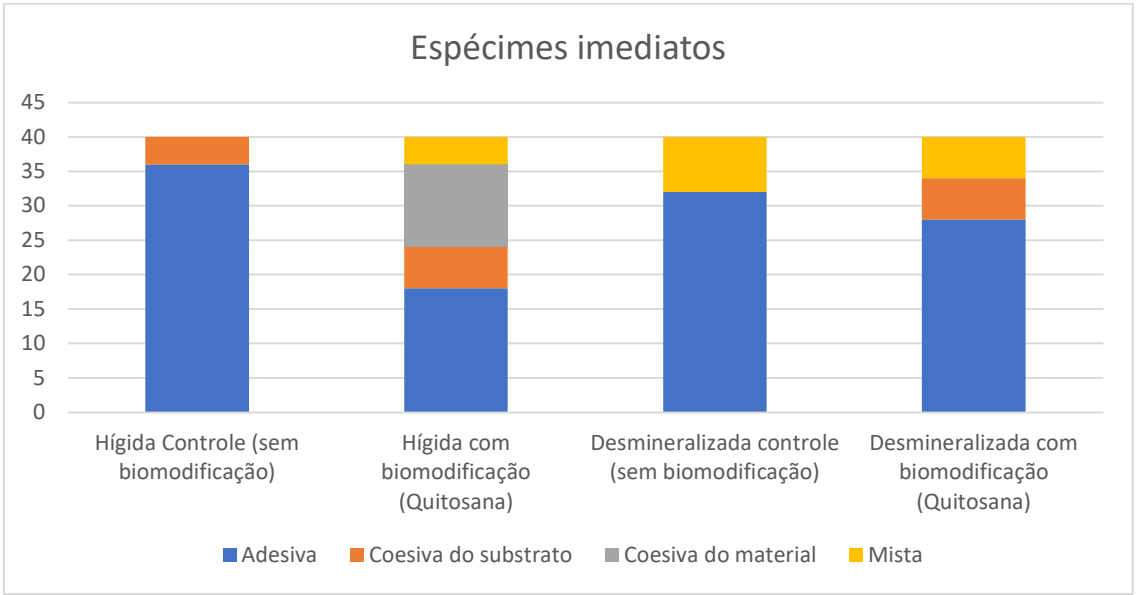

Figura 8. Ilustração dos tipos de falhas observadas após o teste de microtração, dos espécimes dos grupos imediatos (24h).

Tabela 5. Frequência de distribuição dos *scores* atribuídos aos padrões de falha, nos espécimes após envelhecimento da interface adesiva (n= 40).

	Dentina hígida		Dentina desmineralizada	
	Sem quitosana	Com quitosana	Sem quitosana	Com quitosana
Adesiva	28/40	17/40	32/40	36/40
Coesiva Substrato	0/40	1/40	2/40	0/40
Coesiva Material	4/40	3/40	0/40	0/40
Mista	8/40	19/40	6/40	4/40
Mediana	1	3	1	1
	a	b	a	a

**Letras minúsculas diferentes ao final de cada coluna indicam diferença estatisticamente significante (Testes Kruskall-Walis e Dunn, p=0,01).*

Na análise após envelhecimento, também se observou diferença significante (p> 0,05) para os espécimes de dentina hígida tratados com quitosana a 2,5% em relação aos demais grupos, em função da maior incidência de falhas do tipo mista.

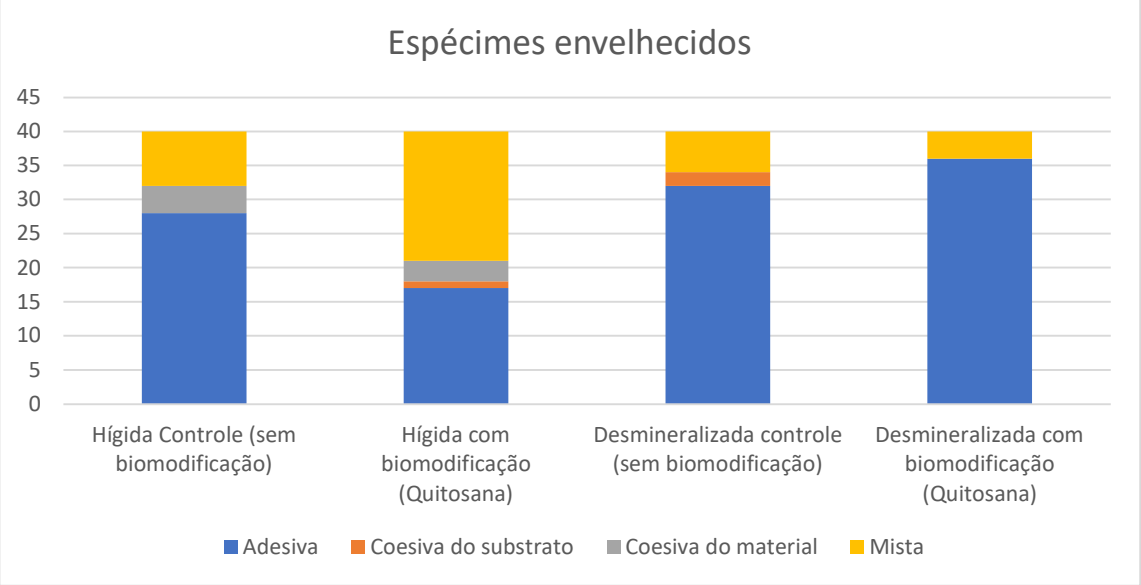

Figura 9. Ilustração dos tipos de falhas observadas após o teste de microtração, dos espécimes dos grupos envelhecidos.

Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) da interface adesiva

A Tabela 4 representa os dados obtidos na análise da porcentagem atômica dos elementos por meio de EDS dos espécimes dos grupos experimentais. Nesta análise foi possível quantificar as concentrações dos elementos Carbono (C), oxigênio (O), fósforo (P) e cálcio (Ca).

Tabela 4. Médias e desvios-padrões da porcentagem atômica (%wt) dos elementos químicos predominante em cada grupo experimental.

	Dentina hígida				Dentina demineralizada			
	Sem quitosana		Com quitosana		Sem quitosana		Com quitosana	
	Imediato	Envelh.	Imediato	Envelh.	Imediato.	Envelh.	Imediato	Envelh.
C	50,43 ± 0,82	40,97 ± 2,86	37,97 ± 2,79	39,73 ± 3,47	38,28 ± 0.28	39,65 ± 0,74	37,00 ± 2,36	38,60 ± 2,00
O	33,40 ± 0,50	42,17 ± 2,73	42,98 ± 10,20	37,52 ± 3,04	42,43 ± 7,00	41,55 ± 4,18	43,21 ± 1,29	40,62 ± 6,68
P	4,89 ± 0,66	5,09 ± 0,00	5,73 ± 1,94	6,80 ± 0,30	5,94 ± 2,10	5,80 ± 1,12	5,98 ± 0,38	6,33 ± 1,41
Ca	10,87 ± 0,97	11,36 ± 0.,2	12,85 ± 5,45	15,65 ± 0,02	13,07 ± 4,45	12,57 ± 2,51	13,43 ± 0,48	13,92 ± 3,31

Observa-se que a maior variação encontra-se nos valores percentuais de carbono. Nos espécimes de análise imediata de dentina hígida sem quitosana encontra-se o maior percentual de carbono, que diminui após o envelhecimento, e mantém-se estável nos espécimes dos demais grupos experimentais, diferindo do oxigênio, que apresentou o menor percentual na análise imediata da dentina hígida sem quitosana, que diminuiu após o envelhecimento e manteve-se estável nos demais grupos experimentais.

Não foram observadas diferenças significantes na concentração dos elementos fósforo (P) e cálcio (Ca), que permaneceram estáveis em todos os grupos, como observado.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da interface adesiva

A análise em MEV das seções restauradas com sistema adesivo/resina composta permitiu verificar a presença de *tags* de resina, camada híbrida e boa interface adesiva nos grupos de dentina sadia e desmineralizada, com e sem biomodificação com solução de quitosana, imediatamente após o procedimento restaurador (Figura 10).

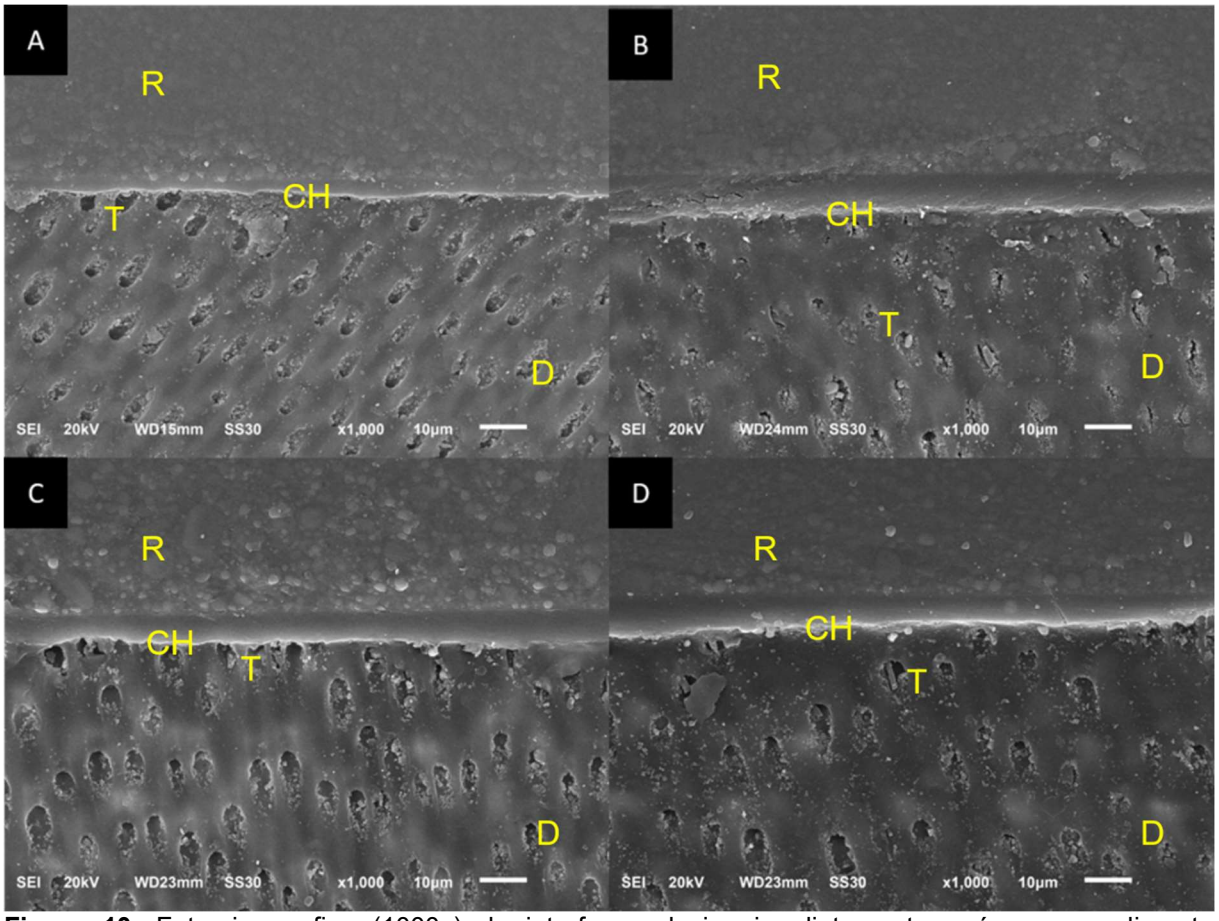

Figura 10. Fotomicrografias (1000x) da interface adesiva imediatamente após o procedimento adesivo de cada grupo: (A) Dentina hígida sem biomodificação; B) Dentina hígida biomodificada com solução de quitosana a 2,5%; (C) Dentina desmineralizada sem biomodificação; D) Dentina desmineralizada biomodificada com solução de quitosana a 2,5%. R=Resina, CH=Camada híbrida, D=Dentina, T=*Tag*.

Para os grupos analisados após o envelhecimento da interface adesiva, verificou-se presença de *tags* de resina, camada híbrida e boa interface adesiva nos grupos de dentina sadia e desmineralizada, com e sem biomodificação com solução de quitosana, porém alguns espécimes apresentaram pequenos *gaps*, principalmente nos grupos de dentina desmineralizada (Figura 11).

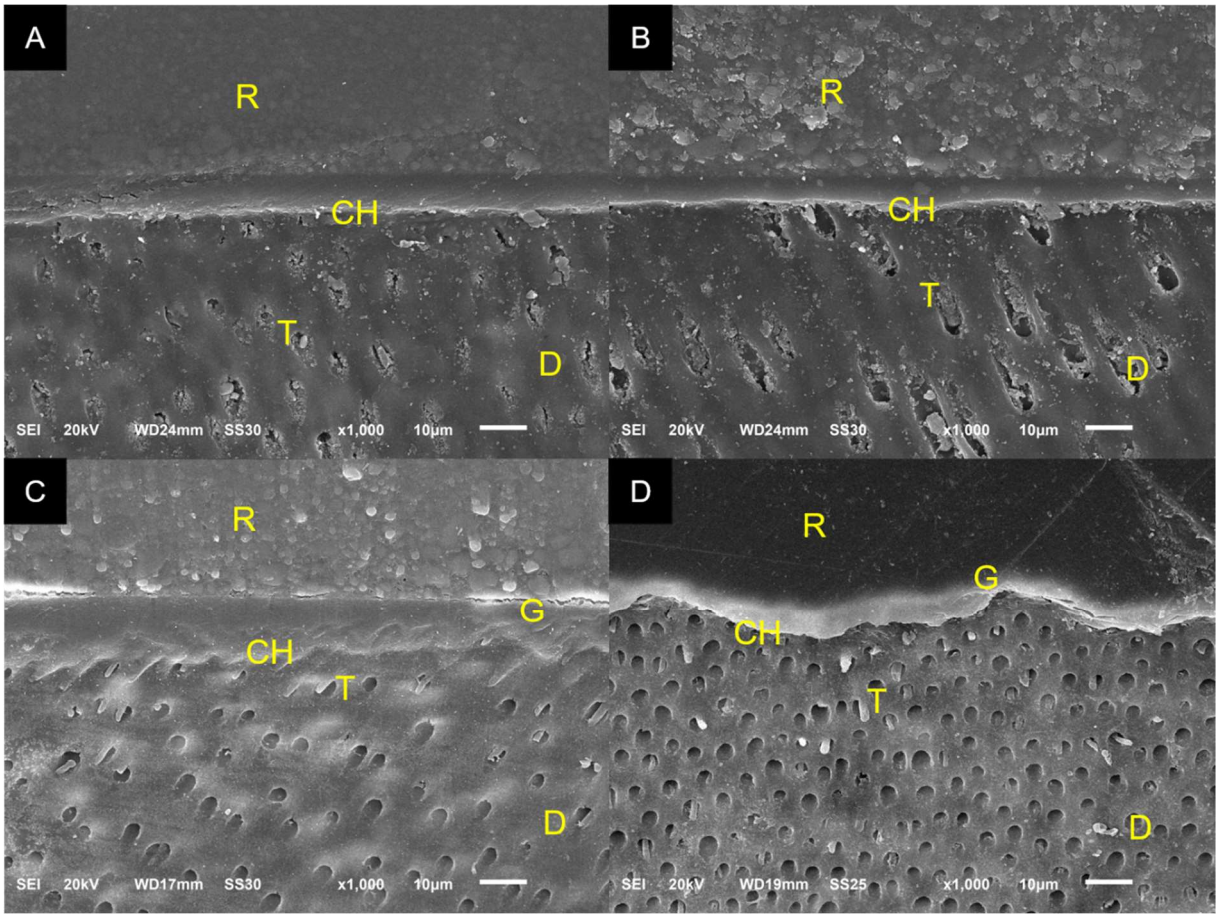

Figura 11. Fotomicrografias (1000x) da interface adesiva imediatamente após o procedimento adesivo de cada grupo: (A) Dentina hígida sem biomodificação; B) Dentina hígida biomodificada com solução de quitosana a 2,5%; (C) Dentina desmineralizada sem biomodificação; D) Dentina desmineralizada biomodificada com solução de quitosana a 2,5%. R=Resina, CH=Camada híbrida, D=Dentina, G=*Gap*, T=*Tag.*

Grau de conversão do monômero adesivo por FTIR

Os valores das médias e desvios-padrões do grau de conversão do monômero adesivo, com e sem o uso prévio da solução de quitosana, foram mensurados e estão apresentados na Figura 12.

A análise estatística detectou diferença significante entre os dois grupos testados (p=0,035). Observou-se menores valores para o grau de conversão do monômero do adesivo após a aplicação da solução de quitosana na superfície da pastilha de brometo de potássio quando comparada à pastilha que continha apenas o adesivo Universal, utilizado para a restauração dos espécimes do estudo.

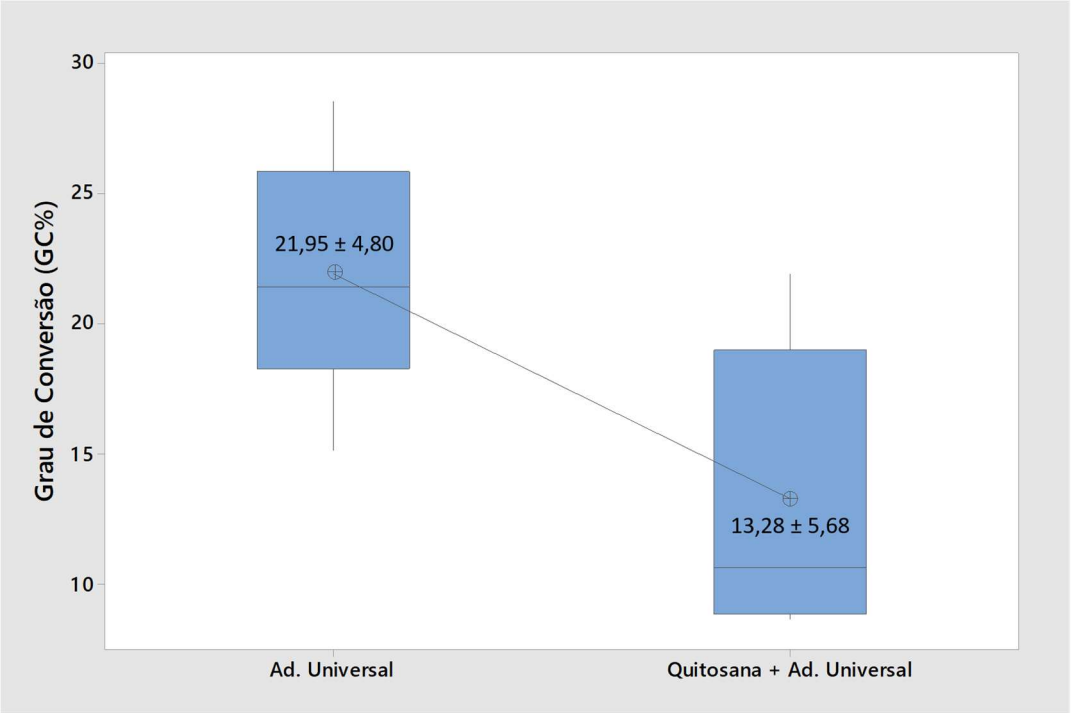

Figura 12. Ilustração gráfica das médias dos valores de grau de conversão, em % dos grupos experimentais.

Discussão

DISCUSSÃO

O uso da quitosana tem-se destacado em diversas áreas da medicina e da odontologia, como auxiliar na regeneração de tecidos moles da cavidade oral (PARK et al., 2020), regeneração óssea (DELAN et al., 2020), auxiliar no tratamento periodontal associado à terapia fotodinâmica (RAD et al., 2019), agente antifúngico para próteses orais (NAMANGKALAKUL et al., 2020), portador potencial de moléculas bioativas na formação da dentina reparadora (WU et al., 2019), soluções irrigantes em canais radiculares (MAZZI-CHAVES et al., 2019), agente antibacteriano em resina composta experimental (MACHADO et al., 2019) atividade antibacteriana sobre biofilmes dentais (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al*., 2017), capacidade de remoção da *smear layer* (ZHOU et al., 2018).

O biopolímero de quitosana é um aminopolissacarídeo linear, composto por glicosamina e unidades de N-acetil glucosamina, unidas por ligações glicosídeas (PATRULEA et al., 2015), ou seja, B- (1-4) -2-amino-2-desoxi-D-glucopiranose e B- (1-4) -2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranose, da reação de desacetilação da quitina (KONG, 2010).

O composto foi identificado em 1811 sob a forma de quitina (PATRULEA et al., 2015; PERIAYAH et al., 2016), e apresenta-se como o segundo biopolímero mais abundante na natureza (IFUKU, 2014). É ecologicamente correto, com propriedades de biocompatibilidade, biodegrabilidade, bioadesão e atoxidade frente ao organismo humano (CHRONOPOULOU *et al*., 2016) e tem a aptidão de desmineralizar o tecido dentinário de forma semelhante ao EDTA, proporcionando limpeza das paredes dentinárias por meio da remoção da *smear layer* (ZHOU et al. 2018), com ação equivalente dos ácidos cítrico e diaminotetracético, porém com a vantagem de ser utilizado em pequenas concentrações e por curto período de tempo (BARROS et al., 2017), além de ser antimicrobiana (RABEA et al., 2003; ELSAKA & ELNAGHY, 2012; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2017) e reduzir a ação das metaloproteinases (PERSADMEHR et al. 2014; ANJANA et al, 2018), o que torna interessante o seu uso em cavidades preparadas de forma minimamente invasiva para remoção de lesões cariosas.

Existe uma variedade de tipos de quitosana, no que diz respeito ao seu grau de desacetilação, estrutura e peso molecular, o que pode influenciar em suas propriedades, como as características de ligação (PINI et al., 2020).

O presente estudo avaliou o uso da quitosana, viabilizado pelo fato de ser biocompatível (RABEA et al., 2003; KURITA, 2006; KONG et al., 2010), como estratégia para preservar a camada híbrida, que consiste na infiltração de monômeros resinosos (CASTELLAN et al., 2013; TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2013) no interior dos espaços interfibrilares da matriz colágena dentinária, responsável pela retenção micromecânica do material restaurador ao substrato (CASTELLAN et al., 2013; SCHEFFEL et al., 2014).

A biomodificação da dentina com uso da solução de quitosana, assim como outros bioativos, é uma estratégia promissora para o reforço da matriz colágena a longo prazo. O uso de biomodificadores na odontologia tem como objetivo aumentar a resistência mecânica do colágeno, na tentativa de melhorar não só a qualidade como também a longevidade de restaurações adesivas.

A escolha da concentração da solução de quitosana de 2,5% foi baseada em estudos prévios, pois não influencia na molhabilidade do adesivo (URURAHY et al., 2017), e pela sua capacidade de formação de camada de fosfato de cálcio sobre a dentina (CURYLOFO-ZOTTI et al., 2017). Além disso, seu uso se mostra efetivo, diante da sua aptidão de formar ligações cruzadas com colágeno tipo I da dentina, o que contribui para o processo de inibição de metaloproteinases que degradam a matriz colágena dentinária (KISHEN et al., 2016). A dissolução da quitosana foi efetuada em ácido acético, vez que insolúvel em água, visto que a desmineralização extra-fibrilar da dentina por quitosana é atribuída exclusivamente à sua capacidade quelante e não ao efeito do solvente (GU et al., 2019).

A resistência de união da interface adesiva foi avaliada pelo teste de microtração, sendo, ainda, realizadas análise química e morfológica da interface e análise de conversão do monômero adesivo posteriormente ao uso da solução de quitosana a 2,5%.

O teste de microtração, proposto por Sano e colaboradores (1994), foi escolhido para mensurar a resistência de união na interface dente/material restaurador, mesmo com a dificuldade técnica do preparo dos espécimes (PASHLEY et al., 1999). Tal teste permite melhor distribuição das tensões e consequentemente menor quantidade de falhas coesivas no substrato (GIANNINI et al., 2004), associado à outras analises, como o EDS para caracterização microscópica de materiais biológicos e a MEV, que permite caracterizar a superfície da amostra (BEDRAN-RUSSO et al., 2011; PROFETA et al., 2012).

Os resultados da análise de resistência de união do presente estudo demonstraram que houve diferença nos espécimes de dentina hígida em relação à dentina desmineralizada.

Sabe-se que a dentina afetada por cárie apresenta pouca mudança estrutural em relação ao colágeno, diferindo da dentina hígida devido aos precipitados mineralizados no interior dos túbulos dentinários (BANERJEE et al., 2013; COSTA et al., 2017), e que a resistência de união é inversamente proporcional ao grau de acometimento da dentina (YOSHIAMA et al., 2002; YOSHIAMA et al., 2003).

Stenhagen e colaboradores (2019) avaliaram o efeito da quitosana metacrilada incorporada em adesivos experimentais, porém esse estudo não apresentou resultados favoráveis ao uso da quitosana na melhoria da resistência de união. Por outro lado, evidenciou-se efetiva propriedade antibacteriana.

Em que pese a existência de estudo contrário (STENHAGEN et al., 2019), observou-se que os espécimes que receberam biomodificação com solução de quitosana a 2,5% tiveram os maiores resultados de resistência de união em relação aos espécimes sem biomodificação, o que demonstra capacidade de interagir eletrostaticamente com a estrutura dentária (PINI et al., 2020), corroborando com outros estudos (RINAUDO, 2006; XU et al., 2011; ELSAKA & ELNAGHY, 2012; FAWZY et al.,2013; DAOOD et al., 2013; HUANG et al., 2019; GU et al., 2019).

Segundo Huang e colaboradores (2019), no teste de microtração à dentina desmineralizada, induzida artificialmente por meio de carboximetil quitosana (CMC), apresentou-se melhor ligação com a resina em relação ao tratamento de superfície convencional, utilizando a técnica de condicionamento ácido previamente ao tratamento restaurador. Assim, o CMC apresentou-se eficiente no direcionamento da mineralização biomimética das fibrilas de colágeno.

De acordo com o estudo de Gu e colaboradores (2019), para se analisar o potencial antibacteriano e estabilidade de união a longo prazo, testes realizados indicaram que a quitosana solubilizada com ácido acético possuía atividades antibacterianas contra três biofilmes de uma única espécie, quais sejam, *Streptococcus mutans, Actinomyces naeslundii e Enterococcus faecalis*. Nesse contexto, observou-se que a estratégia de desmineralização extrafibrilar à base de quitosana retém minerais intrafibrilares, reduz a degradação do colágeno iniciada por proteases endógenas e evita a permeação de água na camada híbrida, além de

eliminar bactérias nas superfícies da dentina, fatores esses cruciais para a melhora da durabilidade da união resina-dentina.

Já o estudo de Machado e colaboradores (2019), demonstrou que a quitosana carregada com triclosan com adição de 5% em peso de uma resina adesiva experimental apresentou propriedades confiáveis, aumentando a atividade antibacteriana imediatamente e após seis meses, bem como induziu a estabilidade da interface adesiva ao longo do tempo.

No presente estudo, observou-se a redução nos valores de resistência de união após o envelhecimento da interface, nos grupos com e sem biomodificação da dentina, tanto em dentina hígida, como em dentina desmineralizada. Sabe-se que o principal fator que contribui para a diminuição da resistência de união ao longo do tempo é a degradação da matriz colágena dentinária, após a ativação das metaloproteinases presentes na matriz, principalmente as do tipo MMP-2 (MAZZONI at al., 2006) e MMP-9, que possuem atividade gelatinolítica (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006).

Neste estudo, *Clostridium histolyticum* colagenase foi utilizada para simular a degradação do colágeno, assim como outros autores (KATO et al., 2012; BOTEON et al., 2017; ZAMPERINI & BEDRAN-RUSSO, 2018). Após o envelhecimento hidrolítico e enzimático dos espécimes, observou-se que os espécimes tratados com solução de quitosana apresentaram maiores valores de resistência de união. Este resultado destaca o potencial da solução de quitosana para garantir o sucesso a longo prazo da interface adesiva, corroborando com estudos anteriores, os quais sugeriram que a quitosana foi capaz de inibir a atividade enzimática da colagenase, aumentando a resistência à degradação do colágeno, o que melhora a força de adesão da resina composta à superfície dentinária (PERSADMEHR et al., 2014 e KISHEN et al., 2016).

Quando analisada a interação da biomodificação dentinária com o envelhecimento da interface adesiva, pode-se observar que os espécimes que receberam biomodificação com solução de quitosana a 2,5% apresentaram os maiores valores de resistência de união, sugerindo que o uso da quitosana é promissor e favorável durante o procedimento restaurador, a fim de melhorar a interface adesiva e permitindo aumentar a longevidade das restaurações em resina composta. Apesar de algumas divergências na metodologia aplicada, principalmente devido à forma como a quitosana foi utilizada, outros estudos também observaram

resultados favoráveis em relação ao uso da quitosana para melhorar a longevidade de restaurações (FAWZY et al., 2012; DIOLOSÀ et al., 2014; CURYLOFO-ZOTTI et al., 2019).

No estudo de Fawzy e colaboradores (2012), foi utilizada a solução de quitosana combinada com riboflavina e observou-se que além do aumento nas propriedades mecânicas, melhorou a estabilidade do substrato de dentina desmineralizada contra os desafios de degradação hidrolítica e/ou colagenolítica e diminuiu a liberação de hidroxiprolina (HYP) com a exposição à colagenase.

Diolosà e colaboradores (2014) avaliaram capacidade de um primer contendo quitosana na resistência de união à dentina. Neste estudo, foi utilizada uma simulação de 5 anos da restauração na cavidade oral pelos métodos de armazenamento estático e dinâmico. Foi observado aumento da resistência de união com o uso da quitosana, além da estabilidade da camada híbrida.

Já no estudo de Curylofo-Zotti e colaboradores (2019) foi utilizada a mesma concentração de solução de quitosana, diferindo da metodologia do estudo pelo fato da remoção seletiva da dentina desmineralizada por meio de laser Er:YAG. Observou-se que a biomodificação da dentina com solução de quitosana promoveu a melhora nos valores de resistência de união imediata e após 6 meses.

Na análise do padrão de falha, observou-se o predomínio de falhas adesivas em todos os grupos experimentais, porém, a análise estatística demonstrou diferença apenas para os grupos de dentina hígida tratada com solução de quitosana, tanto nos espécimes submetidos às análises imediatas, quanto os espécimes envelhecidos. Nesses grupos, nota-se um aumento nas falhas coesivas do substrato e nas falhas mistas, respectivamente. Sabe-se que a maior porcentagem de falhas mistas sugere melhoria na interface adesiva e, consequentemente, na resistência de união de tais grupos (PERDIGÃO, 2007; FANG et al., 2012), o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo.

Na análise em EDS verificou-se que não houve diferenças significativas na concentração dos elementos químicos da interface adesiva, o que é um fator positivo visto que alterações nas relações cálcio/fosfato podem afetar a permeabilidade dos adesivos (ROHANIZADEH et al., 1999), o que pode interferir negativamente no processo de adesão aos substratos dentais.

A análise em MEV deste estudo permitiu verificar que houve formação de camada híbrida e presença de *tags* resinosos nos túbulos dentinários, sugerindo

formação de boa interface adesiva. Nos espécimes que receberam a solução de quitosana, pode-se perceber presença de grânulos, provavelmente provenientes do uso da solução, porém, não interferindo negativamente nas propriedades mecânicas e morfológicas da interface adesiva.

Segundo Beltrame e colaboradores (2018), a MEV revelou que a solução experimental de quitosana teve um efeito favorável na manutenção da integridade das fibrilas de colágeno.

Pela análise do grau de conversão em FTIR, verificou-se que o uso prévio da solução de quitosana a 2,5% alterou o grau de conversão dos monômeros do sistema adesivo. Para que essa análise seja realizada, deve-se medir o porcentual de duplas ligações de carbono que foram convertidas em ligações simples de carbono, para formar uma cadeia polimérica (PEUTZFELDT, 1997). Quanto menor o número residual de ligações duplas entre carbonos após a polimerização, melhores são as propriedades mecânicas do polímero (PEUTZFELDT, 1997).

Os menores valores de grau de conversão observados com o uso da solução de quitosana podem ser explicados devido à falta de evaporação total do solvente previamente à fotopolimerização e, também, devido à sua viscosidade quando em contato com a solução de quitosana, porém esses fatores não puderam ser provados por meio desta pesquisa e indo em oposição ao estudo de Ururahy e colaboradores (2017), que verificou que a quitosana não interfere na molhabilidade do adesivo.

No estudos de Elsaka e & Elnaghy (2012), analisando o grau de conversão e incorporação da quitosana no adesivo, verificou-se que as propriedades antibacterianas de adesivos experimentais recém-preparados e envelhecidos incorporando quitosana exibem um efeito inibitório no crescimento de *Streptococcus mutans* em comparação com a resina adesiva não modificada, aumentando a viscosidade dos adesivos experimentais com o aumento das concentrações de incorporação de quitosana no adesivo. Entretanto, o grau de conversão e os valores de PH diminuíram com o aumento das concentrações de incorporação de quitosana. Notou-se que adesivos experimentais incorporando quitosana 0,12% e 0,25% não demonstrou diferença significativa nos valores de resistência de união em comparação com o controle. Por outro lado, a incorporação de 0,5% e 1% de quitosana no adesivo dentário diminuiu significativamente a resistência de união.

Uma das possíveis explicações para que o grau de conversão tenha sido influenciado negativamente pelo uso da solução de quitosana pode estar relacionada ao fato de que, para o teste de resistência de união, a quitosana foi depositada predominantemente nos túbulos dentinários, uma estrutura diferente da pastilha de brometo de potássio, utilizada para o teste de grau de conversão dos monômeros adesivos.

Apesar das limitações de um estudo *in vitro*, este estudo abre possibilidades para que mais analises sejam feitas e pode gerar novas propostas de protocolos adesivos. Há necessidade de realizar estudos futuros que avaliem os efeitos do uso da solução de quitosana na dentina desmineralizada como agente biomodificador, principalmente *in vivo*, pois a inibição de metaloproteinases é um dos principais fatores que contribuem para a melhora da resistência de união a longo prazo.

Conclusão

Assim, com base na metodologia utilizada e nos resultados obtidos neste estudo, é lícito concluir que:

1. O uso da solução de quitosana a 2,5% melhorou a resistência de união da interface adesiva, imediatamente e após envelhecimento da interface.
2. A solução de quitosana não interferiu negativamente na composição química da interface adesiva.
3. A solução de quitosana não interferiu negativamente na morfologia da interface adesiva.
4. A solução de quitosana interferiu negativamente no grau de conversão dos monômeros do sistema adesivo.

Referências

REFERÊNCIAS

ALEIXO, R.; GUIRALDO, R. D.; FUGOLIN, A. P; BERGER, S. B.; CONSANI, R. L.; CORRER, A. B. Evaluation of contraction stress, conversion degree, and cross-link density in low-shrinkage composites. **Photomed Laser Surg,** v. 32, n. 5, p. 267-273, 2014.

ALVES, D. R; MAGALHÃES, A. P; MOREIRA, F.C.; ESTRELA, C. R.; ESTRELA, C.; CARRIÃO, M. S.; BAKUZIS, A. F.; LOPES, L. G. Silver nanoparticles in resin luting cements: Antibacterial and physiochemical properties**. J Clin Exp Dent**, v. 8, n. 4, p. 415-422, 2010.

ANJANA, J.; MOHANDAS, A.; SEETHALAKSHMY, S.; SURESH, M. K.; MENON, R.; BISWAS, R.; JAYAKUMAR, R. Bi-layered nanocomposite bandages for controlling microbial infections and overproduction of matrix metalloproteinase activity. **Int J Biol Macromol**, [ahead of print] 2018.

BANERJEE, A. Minimal intervention dentistry: part 7. Minimally invasive operative caries management: rationale and techniques. **Br Dent J**, v. 214, n. 3, p. 107-111, 2013.

BARRIOS, R.; FERRER-LUQUE, C. M.; ARIAS-MOLIZ, M. T.; RUIZ-LINARES, M.; BRAVO, M.; BACA, P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. **J Endod**, v. 39, n. 11, p. 1413-1415, 2013.

BARROS, S. E.; FICHT, D.; JANSON, G.; CHIQUETO, K.; FERREIRA, E. Reliability of clinical crown center to predict marginal ridge leveling. **Angle Orthod**, v. 87, n. 4, p. 556-562, 2017.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; CASTELLAN, C. S.; SHINOHARA, M. S.; HASSAN, L.; ANTUNES, A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. **ActaBiomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1735-1741, 2011.

BELTRAME, A. P. C. A.; SUCHYTA, D.; ABD ALRAHEAM, I.; MOHAMMED, A.; SCHOENFISCH, M.; WALTER, R.; ALMEIDA, I. C. S.; SOUZA, L.; MIGUEZ, P. A. Effect of Phosphorylated Chitosan on Dentin Erosion: An in vitro Study. **Caries Res**, v.52, n. 5, p. 378-386, 2018.

BORSATTO, M. C.; MARTINELLI, M. G.; CONTENTE, M. M.; MELLARA, T.; PECORA, J. D.; GALO, R. Bond durability of Er:YAG laser-prepared primary tooth enamel. **Braz Dent J**, v. 24, n. 4, p. 330-334, 2013.

BOTEON AP, KATO MT, BUZALAF MAR, PRAKKI A, WANG L, RIOS D, HONÓRIO HM. Effect of Proanthocyanidin-enriched extracts on the inhibition of wear and degradation of dentin demineralized organic matrix. **Arch Oral Biol**, [ahead of print], 2017.

BRAGA, R. R.; FERRACANE, J. L.; Contraction stress related to degree of conversion and reaction kinetics. **J Dent Res**, v. 81, n. 2, p. 114-118, 2002.

BROSTEK, A. M.; WALSH, L. J.Minimal intervention dentistry in general practice. **Oral Health Dent Manag**, v. 13, n. 2, p. 285-294, 2014.

CALACHE, H.; HOPCRAFT, M. S.; MARTIN, J. M. Minimum intervention dentistry-a new horizon in public oral health care. **Aust Dent J**, v. 58, n. 1, p. 17-25, 2013.

CARRILHO, M. R. O.; CARVALHO, R. M.; GOES, M. F.; DI HIPOLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F. R. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **J Dent Res**, v. 86, n. 1, p. 90-94, 2007.

CASTELLAN, C. S.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; ANTUNES, A.; PEREIRA, P. N.; Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. **Int J Dent**, [ahead of print], 2013.

CHAUSSAIN-MILLER, C.; FIORETTI, F.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. **J Dent Res**, v. 85, n. 1,p. 22-32, 2006.

CHEN Z, CAO S, WANG H, LI Y, KISHEN A, DENG X, ET AL. Biomimetic remineralization of demineralized dentine using scaffold of CMC/ACP nanocomplexes in an in vitro tooth model of deep caries. **PLoS One**, v. 10, n. 1, 2015.

CHRONOPOULOU, L.; NOCCA, G.; CASTAGNOLA, M.; PALUDETTI, G.; ORTAGGI, G.; SCIUBBA, F. Chitosan based nanoparticles functionalized with peptidomimetic derivatives for oral drug delivery. **N Biotechnol**, v. 33, n. 1, p. 23-31, 2016.

CHUNG, J. H, KIM, Y. K, KIM, K. H; KWON, T. Y.; VAEZMOMENI, S. Z.; SAMIEI, M. Synthesis, characterization, biocompatibility of hydroxyapatite-natural polymers nanocomposites for dentistry applications. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 44, n. 1, p. 277-284, 2016.

COSTA, A. R,; GARCIA-GODOY, F.; CORRER-SOBRINHO, L.; NAVES, L. Z.; RAPOSO, L. H.; CARVALHO, F. G.; SINHORETI, M. A.; PUPPIN-RONTANI, R. M. Influence of Different Dentin Substrate (Caries-Affected, Caries-Infected, Sound) on Long-Term μTBS. **Braz Dent J**, v. 28, n. 1, p. 16-23, 2017.

COVARRUBIAS, C.; TREPIANA, D.; CORRAL, C. Synthesis of hybrid copper-chitosan nanoparticles with antibacterial activity against cariogenic Streptococcus mutans. **Dent Mater J**, v. 37, n. 3, p. 397-384, 2018.

CURYLOFO-ZOTTI, F. A.; FERNANDES, M. P.; MARTINS, A. A.; MACEDO, A. P.; NOGUEIRA, L. F. B.; RAMOS, A. P.; CORONA, S. A. M. Caries removal with Er:YAG laser followed by dentin biomodification with carbodiimide and chitosan: Wettability and surface morphology analysis. **Microsc Res Tech**, v. 83, n. 2, p. 133-139, 2019.

CURYLOFO-ZOTTI, F. A.; SCHEFFEL, D. L. S.; MACEDO, A. P.; SOUZA-GABRIEL, A. E.; HEBLING, J.; CORONA, S. A. M. Effect of Er:YAG laser irradiation and chitosan biomodification on the stability of resin/demineralized bovine dentin bond. **J Mech Behav Biomed Mater**, [ahead of print], 2019.

CURYLOFO-ZOTTI, F. A.; TANTA, G. S.; ZUCOLOTO, M. L.; SOUZA-GABRIEL, A. E.; CORONA, S. A. M. Selective removal of carious lesion with Er:YAG laser followed by dentin biomodification with chitosan. **Lasers Med Sci**, [ahead of print], 2017.

CVAR, J. F.; RYGE, G. Reprint of criteria for the clinical evaluation of dental restorative materials. **Clin Oral Investig**, v. 9, n. 9, p. 215-232, 2005.

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**, v. 101, n. 7, p. 1846-1856, 2013.

DELAN, W. K.; ZAKARIA, M.; ELSAADANY, B.; ELMESHAD, A. N.; MAMDOUH, W.; TARIFAS, A. R. Formulação de nanopartículas de sinvastatina quitosana para entrega controlada na regeneração óssea: Otimização usando o design de Box-Behnken, estabilidade e estudo in vivo. **Int J Pharm**, [ahead of print], 2020.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A.; KISHEN, A.; FELITTI, R.; BHAGIRATH, A. Y.; MEDAPATI, M. R.; LAI, C.; CUNHA, R. S. 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**, v. 43, n. 8, p. 1332-1336, 2017.

DIOLOSÀ, M.; DONATI, I.; TURCO, G.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; BRESCHI, L.; PAOLETTI S. Use of methacrylate-modified chitosan to increase the durability of dentine bonding systems. **Biomacromolecules**, [ahead of print], 2014.

EKAMBARAM, M.; YIU, C. K.; MATINLINNA, J. P.; KING, N. M.; TAY, F. R. Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bonds to sound and caries-affected dentine. **J Dent,** v. 42, n. 6, p. 709-719, 2014.

ELSAKA, S.; ELNAGHY, A. Effect of addition of chitosan to self-etching primer: antibacterial activity and push-out bond strength to radicular dentin. **J Biomed Res**, v. n. 4, p. 288-294, 2012.

Erhardt MC, Toledano M, Osorio R and Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. **Dent Mater**, v. 24, n. 6, p. 786-798, 2008.

FANG, M.; LIU, R.; XIAO, Y.; LI, F.; WANG, D.; HOU, R.; CHEN, J. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. **J Dent**, v. 40, n. 6, p. 458-466, 2012.

FAWZY, A. S.; NITISUSANTA, L. I.; IQBAL, K.; DAOOD, U.; BENG, L. T.; NEO, J. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 179, n. 1, p. 278-289, 2013.

FAWZY, A. S.; NITISUSANTA, L. I.; IQBAL, K.; DAOOD, U.; BENG, L. T.; NEO, J. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. **J Mech Behav Biomed Mater**, [ahead of print], 2013.

FERRACANE, J. L.; GREENER, E. H. The effect of resin formulation on the degree of conversion and mechanical properties of dental restorative resins. **J Biomed Mater Res**, v. 120, p. 121-131, 1986.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; BRUNE, V.; SCHÜRMANN, A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. **Caries Res**, v. 38, n. 6, p. 591-596, 2004.

GIANNINI, M.; SOARES, C. J.; DE CARVALHO, R. M. Ultimate tensile strength of tooth structures. **Dent Mater**, v. 20, n. 4, p. 322-329, 2014.

GU, L. S.; CAI, X.; GUO, J. M. PASHLEY, D. H.; BRESCHI, L.; XU, H. H. K.; WANG, X. Y.; TAY, F. R.; NIU, L. N. Chitosan-Based Extrafibrillar Demineralization for Dentin Bonding. **J Dent Res**, v. 98, n. 2, p. 186-193, 2019.

IFUKU, S. Chitin and chitosan nanofibers: preparation and chemical modifications. Molecules. **J Dent**, v. 19, n. 11, p. 18367- 18380, 2014.

KATO, M. T.; LEITE, A. L.; HANNAS, A. R.; CALABRIA, M. P.; MAGALHÃES, A. C.; PEREIRA, J. C. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. **J Dent Res**, v. 91, n. 12, p. 1119-1123, 2012.

KISHEN, A.; SHRESTHA, S.; SHRESTHA, A.; CHENG, C.; GOH, C. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. **Dent Mater**, v. 32, n. 8, p. 968-977, 2016.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **Int J Food Microbiol**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Mar Biotechnol**, v. 8, n. 3, p. 2013-126, 2006.

HASHIMOTO, M.; TAY, F. R.; SVIZERO, N. R.; DE GEE, A. J.; FEILZER, A. J.; SANO, H. The effects of common errors on sealing ability of total-etch adhesives. **Dent Mater**, v. 22, n. 6, p. 560-568, 2006.

HAYASHI, Y.; YAMAUCHI, M.; KIM, S. K.; KUSAOKE, H. Biomaterials: chitosan and collagen for regenerative medicine. **Biomed Res Int**, 2014.

HICKEL, R.; ROULET, J. F.; BAYNE, S.; HEINTZE, S. D.; MJÖR, I. A.; PETERS, M. Recommendations for conducting controlled clinical studies of dental restorative materials. Science Committee Project 2/98--FDI World Dental Federation study design (Part I) and criteria for evaluation (Part II) of direct and indirect restorations including onlays and partial crowns. **J Adhes Dent**, v. 9, n. 1, p. 121-147, 2007.

HICKEL, R.; PESCHKE, A.; TYAS, M.; MJÖR, I.; BAYNE, S.; PETERS, M. FDI World Dental Federation - clinical criteria for the evaluation of direct and indirect restorations. Update and clinical examples. **J Adhes Dent**, v. 12, n. 4, p. 259-272, 2010.

HOLMES, R. G.; RUEGGEBERG, F. A.; CALLAN, R. S.; CAUGHMAN, F.; CHAN, D. C.; PASHLEY, D. H.; LOONEY, S. W. Effect of solvent type and content on monomer conversion of a model resin system as a thin film. **Dent Mater**, v. 23, n. 12, p. 1506-1512, 2007.

HUANG, Z.; QI, Y.; ZHANG, K.; GU, L.; GUO, J.; WANG, R.; MAI, S. Use of experimental-resin-based materials doped with carboxymethyl chitosan and calcium phosphate microfillers to induce biomimetic remineralization of caries-affected dentin. **J Mech Behav Biomed Mater,** v. 89, p. 81-88, 2019.

LENZI, T. L.; TEDESCO, T. K.; SOARES, F. Z.; LOGUERCIO, A. D.; ROCHA, R. O. Chlorhexidine does not increase immediate bond strength of etch-and-rinse adhesive to caries-affected dentin of primary and permanent teeth. **Braz Dent J**, v. 23, n. 4, p. 438-442, 2012.

LIU, Y.; TJADERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; LI, N. MAO, J. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. **J Dent Res**, v. 90, n. 8, p. 953-968, 2011.

MACHADO, A. C.; BEZERRA, S. J. C.; JOÃO-SOUZA, S. H.; CAETANO, T. M.; RUSSO, L. C.; CARVALHO, T. S.; SCARAMUCCI, T. Using fluoride mouthrinses

before or after toothbrushing: effect on erosive tooth wear . **Arch Oral Biol**, 2019, [ahead of print].

MACHADO, A. H. S. GARCIA, I. M.; MOTTA, A. S. D.; LEITUNE, V. C. B.; COLLARES, F. M. Triclosan-loaded chitosan as antibacterial agent for adhesive resin. **J Dent**, v. 83, p. 33-39, 2019.

MALTZ, M.; GARCIA, R.; JARDIM, J. J.; DE PAULA, L. M.; YAMAGUTI, P. M.; MOURA, M. S. Randomized Trial of Partial *vs*. Stepwise Caries Removal: 3-year Follow-up. **J Dent Res**, v. 91, n. 11, p. 1026-1031, 2012.

MALTZ, M.; OLIVEIRA, E. F.; FONTANELLA, V.; CARMINATTI, G. Deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: 40-month follow-up study. **Caries Res**, v. 41, n. 6, p. 493-496, 2007.

MANSO, A. P.; GRANDE, R. H. M.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; REIS, A.; LOGUERCIO AD, PASHLEY DH, et al. Can 1% chlorhexidine diacetate and ethanol stabilize resin-dentin bonds? **Dent Mater**, v. 30. n. 7, p. 735-741, 2014.

MARQUEZAN, P. K.; ALVES, L. S.; DALLA NORA, A.; MALTZ, M.; ZENKNER, J. E. Radiographic pattern of underlying dentin lesions (ICDAS 4) in permanent teeth. **Clin Oral Investig**, v. 23, n. 10, p. 3879-3883, 2019.

MAZZI-CHAVES, J. F.; MARTINS, C. V.; SOUZA-GABRIEL, A. E.; BRITO-JÙNIOR, M.; CRUZ-FILHO, A. M.; STEIER, L.; SOUSA-NETO, M. D. Effect of a chitosan final rinse on the bond strength of root canal fillings. **Gen Dent**, v. 67, n. 5, p. 54-57, 2019.

MAZZONI, A.; PASHLEY, D. H.; NISHITANI, Y.; BRESCHI, L.; MANNELLO, F.; TJÄDERHANE, L.; TOLEDANO, M.; PASHLEY, E. L.; TAY, F. R. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. **Biomaterials**, v. 27, n. 25, p. 4470-4476, 2006.

MENA-SERRANO, A.; KOSE, C.; DE PAULA, E. A.; TAY, L. Y.; REIS, A.; LOGUERCIO, A. D. A new universal simplified adhesive: 6-month clinical evaluation. **J Esthet Restor Dent**, v. 25, n. 1, p. 55-69, 2013.

MOHER, D.; HOPEWELL, S.; SCHULZ, K. F.; MONTORI, V.; GØTZSCHE, P. C.; DEVEREAUX, P. J. Explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. **Int J Surg**, v. 10, n. 1, p. 28-55, 2012.

NAMANGKALAKUL, W.; BENJAVONGKULCHAI, S.; POCHANA, T.; PROMCHAI, A.; SATITVIBOON, W.; HOWATTANAPANICH, S.; PHUPRASONG, R.; UNGVIJANPUNYA, N.; SUPAKANJANAKANTI, D.; CHAITRAKOONTHONG, T.; MUANGSAWAT, S.; THANYASRISUNG, P.; MATANGKASOMBUT, O. Activity of chitosan antifungal denture adhesive against common Candida species and Candida albicans adherence on denture base acrylic resin. **J Prosthet Dent**, v. 123, n. 1, p. 181. e1-181, 2020.

OZ A. A; COMERT, S. Clinical effect of a fluoride-releasing and rechargeable primer in reducing white spot lesions during orthodontic treatment. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 157, n. 1, p. 67-72, 2019.

PACHECO, L. F.; BANZI, É.; RODRIGUES, E.; SOARES, L. E.; PASCON, F. M.; CORRER-SOBRINHO, L. Molecular and structural evaluation of dentin caries-like lesions produced by different artificial models. **Braz Dent J**, v. 24, n. 6, p. 610-618, 2013.

PARK, K. M.; LEE, H. J.; KOO, K. T.; BEN AMARA, H.; LEESUNGBOK, R.; NOH, K.; LEE, S. C.; LEE, S. W. Oral Soft Tissue Regeneration Using Nano Controlled System Inducing Sequential Release of Trichloroacetic Acid and Epidermal Growth Factor. **Tissue Eng Regen Med**, [ahead of print], 2020.

PASHLEY, D. H.; CARVALHO, R. M.; SANO, H.; NAKAJIMA, M.; YOSHIYAMA, M.; SHONO, Y. The microtensile bond test: a review. **Journal Adhes Dent**, v. 1, n. 4, p. 299-309, 1999.

PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 97, p. 417-426, 2015.

PERDIGÃO, J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. **Dent Mater**, v. 26, n. 2, p. 24-27, 2010.

PERDIGÃO, J. New developments in dental adhesion. **Dent Clin North Am**, v. 51, n. 2, p. 333-357, 2007.

PERIAYAH, M. H.; HALIM, A. S.; SAAD, A. Z. Chitosan: A Promising Marine Polysaccharide for Biomedical Research. **Pharmacogn Rev**, v. 10, n. 19, p. 39-42, 2016.

PERSADMEHR, A.; TORNECK, C. D; CVITKOVITCH, D. G.; PINTO, V.; TALIOR, I.; KAZEMBE, M. Bioactive chitosan nanoparticles and photodynamic therapy inhibit collagen degradation in vitro. **J Endod**, v. 40, n. 5, p. 703-709, 2014.

PEUTZFELDT, A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. **Eur J Oral**, v. 105, n. 2, p. 97-116, 1997.

PINI, N. I. P.; LIMA DANL, LUKA, B.; GANSS, C.; SCHLUETER, N. Viscosity of chitosan impacts the efficacy of F/Sn containing toothpastes against erosive/abrasive wear in enamel. **J Dent**, [ahead of print], 2020.

PINTADO-PALOMINO, K. Estudo clínico randomizado e duplo-cego do Biosilicato sob restaurações de resina composta em dentes afetados por cárie. Ribeirão Preto. Tese [Doutorado em Odontologia] – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2017.

PROFETA, A. C.; MANNOCCI, F.; FOXTON, R. M.; THOMPSON, I.; WATSON, T. F.; SAURO, S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin–

dentine interface: a microtensile bond strength, scanning electron and confocal microscopy study. **Eur J Oral Sci**, v. 120, p. 353-362, 2012.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromol**. v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

RAD, M. R.; POURHAJIBAGHER, M.; ROKN, A. R.; BARIKANI, H. R.; BAHADOR, A. Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green Doped with Chitosan Nanoparticles on Biofilm Formation-Related Gene Expression of Aggregatibacter actinomycetemcomitans. **Front Dent**, v. 16, n. 3, p. 187-193, 2019.

RICCI, H. A.; SCHEFFEL, D. L; MARIUSSO, M. R.; SPOLIDORIO, D. M.; DE SOUZA COSTA, C. A.; HEBLING, J. Exposed collagen in resin bonds to caries-affected dentin after dentin treatment with aqueous and alcoholic chlorhexidine solutions. **J Adhes Dent**, v. 16, n. 1, p. 21-28, 2014.

RINAUDO, M. Non-covalent interactions in polysaccharide systems. **Macromol Biosci**, v. 6, n. 8, p. 590-610, 2006.

RODRIGUES, M. R. Synthesis and investigation of chitosan derivatives formed by reaction with acyl choride. **J Carbohydr Chem**, v. 24, n. 41. 2005.

ROHANIZADEH, R.; LEGEROS, R. Z.; FAN, D.; JEAN, A.; DACULSI, G. Ultrastructural properties of laser-irradiated and heat-treated dentin. **J Dent Res**, v. 78, n. 12, p. 1829-1835, 1999.

SANO, H.; SHONO, T.; SONODA, H.; TAKATSU, T.; CIUCCHI, B.; CARVALHO, R.; PASHLEY, D. H. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength--evaluation of a micro-tensile bond test. **Dental Materials**, v. 10, n. 4, p. 236-240, 1994.

SCHEFFEL, D. L; HEBLING, J.; SCHEFFEL, R. H.; AGEE, K. A.; CADENARO, M; TURCO, G.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; COSTA, C. A.; PASHLEY, D. H. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. **Dent Mater**, v. 30, n. 2, p. 227-233, 2014.

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

SILVA, P. V.; GUEDES, D. F.; NAKADI, F. V.; PECORA, J. D.; CRUZ-FILHO, A. M. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. **Int Endod J**, v. 46, n. 4, p. 332-338, 2013.

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

SPENCER, P.; WANG, Y.; KATZ, J. L.; MISRA, A. Physicochemical interactions at the dentin/adhesive interface using FTIR chemical imaging. **J Biomed**, v. 10, n. 3, 2005.

STANSBURY, J. W.; DICKENS, S. H. Determination of double bond conversion in dental resins by near infrared spectroscopy. **Dent Mater,** v. 17, n. 1, p. 71-79, 2001.

STENHAGEN, I. S. R.; RUKKE, H. V, DRAGLAND, I. S.; KOPPERUD, H. M. Effect of methacrylated chitosan incorporated in experimental composite and adhesive on mechanical properties and biofilm formation. **Eur J Oral Sci**, v. 127, n. 1, pg. 81-88, 2019.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; MUTLUAY, M.; SESEOGULLARI-DIRIHAN, R.; AGEE, K. A.; KEY, W. O.; SCHEFFEL, D. L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; TJÄDERHANE, L.; NISHITANI, Y.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. **J Dent Res**, v. 92, n. 1, p. 87-91, 2013.

TYAS, M. J.; ANUSAVICE, K. J.; FRENCKEN, J. E.; MOUNT, G. J. Minimal intervention dentistry--a review. **Int Dent J**, v. 50, n. 1, p. 1-12, 2000.

TOLEDANO, M.; OSORIO, R.; OSORIO, E.; AGUILERA, F. S.; YAMAUTI, M.; PASHLEY, D. H. Effect of bacterial collagenase on resin-dentin bonds degradation. **J Mater Sci Mater Med**, v. 18, n. 12, pg. 2355-2361, 2007.

URURAHY, M. S.; CURYLOFO-ZOTTI, F. A.; GALO, R.; NOGUEIRA, L. F.; RAMOS, A. P.; CORONA, S. A. Wettability and surface morphology of eroded dentin treated with chitosan. **Arch Oral Biol**, v. 75, pg. 68-73, 2017.

VIDAL, C. M.; TJADERHANE, L.; SCAFFA, P. M.; TERSARIOL, I. L.; PASHLEY, D.; NADER, H. B. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. **J Dent Res**, v. 93, n. 3, p. 269-274, 2014.

WU, S.; ZHOU, Y.; YU, Y.; ZHOU, X.; DU, W.; WAN, M.; FAN, Y.; ZHOU, X.; XU, X.; ZHENG, L. Evaluation of Chitosan Hydrogel for Sustained Delivery of VEGF for Odontogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. **Stem Cells Int**, v.19, 2019.

YOSHIYAMA, M.; TAY, F. R.; DOI J, NISHITANI Y, YAMADA T, ITOU K, CARVALHO RM, NAKAJIMA M, PASHLEY DH. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. **J Dent Res**, v. 81, n. 8, p. 556-560, 2002.

YOSHIYAMA, M,. TAY, F. R.; TORII, Y.; NISHITANI, Y.; DOI, J.; ITOU, K.; CIUCCHI, B.; PASHLEY, D. H. Resin adhesion to carious dentin. **Am j dent**, v. 16, n. 1, p. 556-560, 2003.

YUAN, Y.; SHIMADA, Y.; ICHINOSE, S.; TAGAMI, J. Effect of dentin depth on hybridization quality using different bonding tactics in vivo. **J Dent**, v. 35, n. 8, p. 664-672, 2007.

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**, v. 98, n.1, p. 150-159, 2011.

ZAMPERINI, C. A.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Remineralization Potential of Mints Containing Bioactive Agents in Artificially Induced Root Caries. **Caries Res**, v. 52, n. 4, p. 331-338, 2018.

ZHANG, X.; LI, Y.; SUN, X.; KISHEN, A.; DENG, X.; YANG, X. Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nano-complexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. **J Mater Sci**, v. 25, n. 12, p. 26, 2014.

ZHOU, H.; LI, Q.; WEI, L.; HUANG, S.; ZHAO, S. A comparative scanning electron microscopy evaluation of smear layer removal with chitosan and MTAD. **Niger J Clin Pract**, v. 21, n. 1, p. 76-80, 2018.

ZHOU, J.; SHIBATA, Y.; TANAKA, R.; ZHANG, Z.; ZHENG, K.; LI, Q.; IKEDA, S.; GAO, P.; MIYAZAKI, T. Quantitative/qualitative analysis of adhesive-dentin interface in the presence of 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate**. J Mech Behav Biomed Mater**, 2019, [ahead of print].