

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

MIRIAN SAAVEDRA LOPES

**EFEITO DA QUITOSANA FOSFORILADA E CARBODIIMIDA NA
MOLHABILIDADE E NOS COMPONENTES ORGÂNICOS DA
DENTINA ERODIDA**

**Ribeirão Preto
2019**

MIRIAN SAAVEDRA LOPES

**EFEITO DA QUITOSANA FOSFORILADA E CARBODIIMIDA NA
MOLHABILIDADE E NOS COMPONENTES ORGÂNICOS DA
DENTINA ERODIDA**

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

Programa: Odontologia Restauradora

Área de concentração: Dentística

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, Mirian Saavedra

Efeito da quitosana fosforilada e carbodiimida na molhabilidade e nos componentes orgânicos da dentina erodida. Ribeirão Preto, 2019.

Tese Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora: Área de concentração: Dentística Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Orientadora: Corona, Silmara Aparecida Milori

1. Erosão. 2. Molhabilidade. 3. Dentina 4. Ângulo de contato. 5. Força Atômica. 6. FTIR

FOLHA DE APROVAÇÃO

LOPES MS. EFEITO DA QUITOSANA FOSFORILADA E CARBODIIMIDA NA MOLHABILIDADE E NOS COMPONENTES ORGÂNICOS DA DENTINA ERODIDA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutora em Ciências.
Programa: Odontologia Restauradora. Área de
concentração: Dentística.

Aprovado em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

MIRIAN SAAVEDRA LOPES

- Nascimento** 8 de Março de 1968. Rio de Janeiro-RJ
- Filiação** Angel Saavedra Guzman
Helenita Lopes de Saavedra
- 1990-1995** Curso de Graduação
Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP)
- 1998-1999** Curso de aperfeiçoamento em Reabilitação Oral
Associação Odontológica de Ribeirão Preto
- 2013-2015** Curso de pós-graduação (Mestrado) em Odontologia
Área de concentração: Dentística
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP
- 2016-2019** Curso de pós-graduação (Doutorado) em Odontologia
Área de concentração: Dentística
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP



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

Dedicatoria

DEDICO ESTE TRABALHO

Deus, o princípio e propósito de tudo....por ser meu guia e meu mestre espiritual...por validar constantemente minhas potencialidades...por ser colo em todas minhas necessidades...e assim sendo , de maneira única e iluminada por toda compaixão e pela oportunidade de conclusão de mais este trabalho!!! Reverência de alma em GRATIDÃO!!!!

Aos meus pais, **Angel Saavedra Guzmán e Helenita Lopes de Saavedra** (*in memoriam*), pelo exemplo de ensinamento amoroso e genuíno com o qual conduziram minha formação pessoal, emocional e espiritual, durante todo o tempo que estiveram presencialmente ao meu lado nessa vida!! e pela confirmação diária, ainda que já em outro plano existencial, de que o amor verdadeiro é imortal... e que podemos senti-lo em cada inspiração... em cada momento difícil atravessado... Certa de que jamais caminho sozinha, sou grata por cada "abraço" de presença, seja por uma intuição....seja por uma coragem. Obrigado por caminharem ao meu lado... posso senti-los como grandes orientadores espirituais em minha vida!!!Amores eternos!!!! NAMASTÊ !!!!!

Ao meu filho, **Pedro Ney**, por dar sentido a tudo e me mostrar todos os dias o quanto vale a pena viver, apesar dos obstáculos! Que presente; essa mágica oportunidade de estar sua mãe nessa encarnação!!!! A beleza de sua alma, sempre será meu combustível... sua paciência com todas as minhas vulnerabilidades, ressoam em mim GRATIDÃO... sua alegria de viver, e esse seu sorriso FANTÁSTICO e ÚNICO foram as armas que me capacitaram e me conduziram para mais esse enfrentamento e VITÓRIA !!! Por você... com você... e pra você sempre meu grande amor!!!! Te amo por todo sempre!!!!

A minha Avó, **Marieta Martins Lopes de Andrade** (*in memoriam*) *Sabedoria nata*, que foi referência de alma em minha construção de vida !!!! Quão belo foi toda convivência com você!!! Gratidão eterna, minha amada!!!!

À minha amada irmã, **Milena Saavedra Lopes do Amaral**, toda honra e GRATIDÃO pela rica oportunidade de seu, companheirismo e amor!!!! Seu exemplo de conduta diante da vida, lembra-me sempre sobre o meu propósito existencial, como fonte de sabedoria!!! Fortalecedor é caminhar ao seu lado, ainda que de longe... experienciar o ilimitável poder do espírito, quando o objetivo é evoluir!!!! Minha mestre de vida... e de deliciosos brigadeiros!!!! Sim... uma irmandade de MÃE!!!! Assim sempre é seu jeito maternal de ser... de uma preocupação amorosa e fiel!!! Obrigada por tudo, obrigada por existir e fazer diferença em minha vida... Meu grande exemplo de força. Sem sua lucidez genuína e seu acolhimento, mais uma vez, com certeza eu não teria chegado até aqui!!!!O amor alimenta a alma e é assim que me abasteço nos momentos em que estamos juntas !!!Como eu te amo!!!!

À minha orientadora, **Professora Dra. Silmara Aparecida Milori Corona**, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito e admiração por sua serenidade, capacidade de análise do perfil de seus alunos, e pelo seu Dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência. Pela sua solicitude e solidariedade perante minhas dificuldades. Fez-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, mas vidas humanas... Mais uma vez, você não foi somente orientadora, mas em alguns momentos, conselheira, confidente, mãe e amiga. Você foi e sempre será muito além de que uma referência profissional, mas com maestria uma referência pessoal para o meu crescimento!! De novo, você acreditou no meu trabalho...e o resultado está aqui!!!!!!

Ao meu irmão, **Miguel Angel Saavedra Lopes**, Quanta luz existe em teu olhar...quanto AMOR existe em teu falar!!!! Alma nobre ...amor genuíno ...em tudo o que faz!!!!Exemplo único de determinação e disciplina... sua presença em minha vida , mais que um presente é uma rica oportunidade de evolução !!! Impecável em todos os sentidos!!. Como diz nossa irmã, você já nasceu nobre!!!! A maneira com que sempre demonstra gentileza, faz sua presença diferente e única em minha vida!!!!Como eu te

amo...como sou grata pela oportunidade de ser sua irmã!!!! Por você sempre em minha vida, esse é meu sempre desejo!!!!Como eu te amo !!!!

Ao meu irmão, **Marcus Vinicius Saavedra Lopes**, pelo amor colocado em cada abraço silencioso, pela força em cada telefonema...Tanto AMOR por traz desse olhar de militar rígido...tanta preocupação por traz desse silêncio!!!!Obrigado por todo seu amor e por me fazer sentir o quanto está perto de mim, mesmo de longe!!!!Como eu te amo!!!!

A minha prima-irmã, **Daniella Lopes Rodrigues**, pelo maior exemplo de resiliência e enfrentamento que já conheci!!!Fonte eterna de celebração à vida e a alegria....aprendi com você a mágica da celebração!!!Sentir sua torcida sempre por minhas vitórias é um presente!!!Quando uma prima é criada como uma irmã, somos presenteados por um AMOR especial de vida, que faz toda a diferença...que torna belo o viver!!! Obrigada minha amada prima por tão elegante e iluminada presença em minha vida...AMO MUITO VOCE!!!! Voce é minha grande referência de brinde à vida!!!!

Agradecimentos Especiais

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

Aos meus sobrinhos, **André Luiz Saavedra do Amaral** (pequenino ser de luz que carrega tanto AMOR no sorriso e no olhar...personalidade forte regada de amorosidade e entrega...como EU AMO ter você...!!!!) **Rafael Lopes de Oliveira** (menino lindo...sua garra e sua energia contagiante me encantam...força é seu nome !!! Amo muito você !!), **Ana Luiza Ribeiro Saavedra Lopes, Ana Carolina Ribeiro Saavedra Lopes e Vinícius Ribeiro Saavedra Lopes**,(pacote de presente amoroso...cada um com sua personalidade única, mas todos cheios de AMOR e vida pra se viver...amo partilhar a vida com cada um de vocês) todos por enriquecerem minha vida com esse amor único. Relíquias da minha vida!!!Como amo todos vocês !!!!!

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

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

Às melhores Amigas que a vida pode me dar, **Rita de Cássia dos Santos , Daniela C. Seabra , Giselle Moraes Lourenço e Eliane Resende**, pela presença constante em minha vida, me acolhendo e auxiliando na grande tarefa de ressignificar a vida ... permitindo que minha caminhada fosse mais leve... Minha gratidão e meu eterno amor por vocês!!!!Feliz de quem não caminha sozinho e ainda pode esbanjar AMOR nas grandes parcerias da vida!!! Privilégio poder contar vocês !!!!!

À minha amiga querida **Rita Bayona Nogueira** , por toda oração sincera ...por todo carinho e por todas orientações iluminadas que sempre me acolheram !!! Obrigada por tudo !!!Amo você minha amiga!!!

À minha amada amiga **Ivandira e família**, que presente poder sentir o amor de vocês constantemente!!!! Muito obrigada por todas as orações e por toda torcida sempre!!! Amo muito todos vocês !!!!

Aos amigos **Isabella Rodrigues Ziotti, Marina Godoy, Reinaldo Dias da Silva Neto, Fabiana Curylofo, Thiago Cortês e Bruna Moreira** pela família formada durante o doutorado. Obrigado a cada um de vocês pela sempre paciência em me auxiliar, pelo carinho e companheirismo!!!

Ao meu cunhado **Leonardo Lira do Amaral**, pela prontidão em sempre me auxiliar engrandecendo e direcionando meu trabalho com a maestria de seus conhecimentos, por toda calma e solicitude!! Obrigado por tudo!!

Às minhas cunhadas **Michele Ribeiro Contim e Adriane Ribeiro Saavedra Lopes**,...e a gente vai aprendo que sentir o AMOR tem várias facetas e que não é preciso estar sempre conectado, porque é exatamente nos detalhes de presenças genuínas que nossa alma é tocada!!!! pelo carinho e torcida em minha caminhada!!!

À minha amiga **Josiane Perussi**, presenças de luz são eternas...por isso sou grata de maneira contínua pela oportunidade de conviver com tão nobres conhecimentos!! E por falar de você..."Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota." (Maria Teresa de Călcută).

Ao meu psicólogo **Rodolfo Mihara** Como referenciar você ...como falar de seu acolhimento profissional...."Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana".(Carl Jung).Quanta gratidão pela oportunidade de encontra-lo em meu caminho e poder vivenciar um trabalho terapêutico tão fortalecedor e genuíno!!!!Aprender a ressignificar minha história de vida com suas orientações, está sendo iluminado e transformador!!!Vários momentos da execução desse trabalho, contaram com as reflexões oriundas de seu belíssimo trabalho!!!NAMASTÊ!!!!!!

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

À minha amiga **Alice Soares Sibata**, pela rica oportunidade de poder conviver com tanta sabedoria implícita em tanta simplicidade...exatamente esse seu diferencial!!!! Referência de indulgência ...humanismo...e Empatia...lição de vida constante!!!Obrigada por validar minhas potencialidades e pelo acréditamento constante... estou aprendendo com você que acreditar no " outro " é apenas uma questão de olhar com amorosidade!! "Motivação é a arte de fazer as pessoas fazerem o que você quer que elas façam porque elas o querem fazer " (Dwight Eisenhower)

À minha amada amiga tia **Denilde Lourenço** por toda escuta amorosa e pelas orientações sempre que precisei...sua fala sempre faz diferença!!!! Obrigada por tudo !!!!!

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

À minha querida amiga **Maria Aparecida Câmara**...como agradecer tanto amor...tanta preocupação e cuidado?!!!! Seu carinho comigo sempre foi o diferencial... desejo que Deus continue abençoado a nossa amizade !!!!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual diretor, **Professora Doutora Léa Assed Bezerra da Silva**, e o Vice-Diretor, **Professor Doutor Arthur Belém Novaes Júnior**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Professora Doutora Raquel Assed Bezerra Segato**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, área de concentração em Odontologia Restauradora, na pessoa do | **Professor Doutor Antônio Miranda da Cruz filho** e do Vice-Coordenador, **Professor Doutor Ricardo Gariba Silva**.

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

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

À **Professora Doutora Ana Paula Ramos** do departamento de superfícies e colóides da faculdade de química da Universidade de São Paulo, pela prontidão na utilização dos equipamentos utilizados nas análises dessa pesquisa e pelo apoio durante a realização das metodologias e suas respectivas interpretações.

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

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

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

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

Resumo

RESUMO

Lopes, M.S. **Efeito da quitosana fosforilada e carbodiimida na molhabilidade e nos componentes orgânicos da dentina erodida.** Ribeirão Preto, 2019. 97p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2019.

O emprego de biomodificadores como a quitosana fosforilada e a carbodiimida podem melhorar a qualidade e a longevidade dos procedimentos restauradores realizados na dentina erodida. Este estudo foi composto por dois experimentos independentes. O experimento 1, avaliou o efeito da quitosana fosforilada a 2,5% e carbodiimida a 0,5 mol / L na molhabilidade, energia livre de superfície e análise de superfície da dentina erodida (MEV). Cento e quarenta e quatro espécimes de dentes bovinos foram selecionados aleatoriamente. Eles foram então divididos em seis grupos de acordo com o substrato da dentina: Hígida e erodida e a biomodificação da dentina: solução de quitosana fosforilada a 2,5%, solução de carbodiimida a 0,5 mol / L e sem biomodificação (controle). Setenta e duas amostras foram submetidas a um desafio erosivo por imersão em ácido cítrico a 0,3% (pH = 3,2) por duas horas. Para análise de molhabilidade (n = 12), setenta e duas amostras de dentina bovina (4,0x4,0x2,5) foram previamente planejadas e polidas. Em seguida, uma gota do sistema adesivo Single Bond Universal (3M) foi depositada em cada superfície para obter as medições. Os ângulos de contato entre a superfície da dentina e o adesivo foram medidos por meio de um goniômetro. Para a análise da energia de superfície livre, cinquenta e quatro amostras (n = 3) foram submetidas a novas medidas de ângulo de contato, desta vez usando três solventes orgânicos com polaridades distintas, respectivamente água, formamida e diodometano. Para análise morfológica superficial, dezoito espécimes (n = 3) foram utilizados e analisados por microscopia eletrônica de varredura. Os testes estatísticos utilizados foram o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e a análise de variância (ANOVA) (p> 0,05). O teste de Tukey (p≤0,05) foi utilizado para comparações múltiplas. O tratamento de superfície com solução de quitosana fosforilada a 2,5% e carbodiimida a 0,5 mol / L não influenciou a molhabilidade da dentina (p> 0,05). A energia livre de superfície aumentou apenas quando o solvente polar (água) foi usado. O tratamento superficial com quitosana fosforilada a 2,5% promoveu desmineralização na superfície da dentina e aumentou a boca do túbulo dentinário. O experimento 2, avaliou o efeito da quitosana fosforilada a 2,5% e carbodiimida a 0,5 mol / L, nos componentes orgânicos da dentina erodida por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, n = 5) em triplicado e por microscopia de força atômica (AFM, n = 2), para investigar a morfologia da superfície. Trinta amostras de dentina bovina (4,0x4,0x2,5) foram submetidas a desafio erosivo por imersão em ácido cítrico a 0,3% (pH = 3,2) por duas horas. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em seis grupos, de acordo com o substrato da dentina: hígida e erodido e a biomodificação da dentina: sem biomodificação (controle), quitosana fosforilada a 2,5% e carbodiimida a 0,5 mol / L. As amostras sem biomodificação e as biomodificadas com carbodiimida foram condicionadas com ácido fosfórico a 35%. Maiores diferenças de interação foram observadas na presença de quitosana fosforilada ao comparar amostras biomodificadas com o controle (sem biomodificação); sugerindo que essa biomolécula é adsorvida em maior quantidade na superfície da dentina quando comparada às amostras biomodificadas com carbodiimida. Na análise AFM, a biomodificação de dentina hígida e erodida com quitosana fosforilada promoveu desmineralização superficial e túbulos dentinários obliterados, predominantemente quando comparada às amostras biomodificadas com carbodiimida. Maior adsorção de biomoléculas de quitosana fosforilada na superfície da dentina em comparação com biomoléculas de carbodiimida.

Palavras-chave: dentina erodida, quitosana fosforilada, carbodiimida, molhabilidade, ângulo de contato, AFM e FTIR

Abstract

ABSTRACT

Lopes, M.S. Effect of Phosphorylated Chitosan and Carbodiimide on Wettability and Organic Components of Eroded Dentin. Ribeirão Preto, 2019. 97p. [Doctoral thesis]. Ribeirão Preto: Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo; 2019.Lopes, M.S

The use of biomodifiers such as phosphorylated chitosan and carbodiimide may improve the quality and longevity of restorative procedures performed on eroded dentin. This study consisted of two independent experiments. Experiment 1 evaluated the effect of 2.5% phosphorylated chitosan and 0.5mol / L carbodiimide on wettability, surface free energy and surface analysis of eroded dentin (SEM). One hundred forty-four bovine tooth specimens were randomly selected. They were then divided into six groups according to the dentin substrate: sound or eroded and dentin biomodification: 2.5% phosphorylated chitosan solution, 0.5 mol / L carbodiimide solution and no biomodification (control) . Seventy-two specimens were subjected to an erosive challenge by immersing in 0.3% citric acid (pH = 3.2) for two hours. For wettability analysis (n = 12) seventy-two bovine dentin specimens (4.0x4.0x2.5) were previously planned and polished. Then a drop of the Single Bond Universal (3M) adhesive system was deposited on each surface to obtain the measurements. The contact angles between the dentin surface and the adhesive were measured by means of a goniometer. For the free surface energy analysis fifty four specimens (n = 3) were subjected to new contact angle measurements, this time using three organic solvents with distinct polarities, respectively water, formamide and diodomethane. For superficial morphological analysis, eighteen specimens (n = 3) were used and analyzed by scanning electron microscopy. The statistical tests used were the normality test (Kolmogorov-Smirnov) and analysis of variance (ANOVA) ($p > 0.05$). Tukey's test ($p \leq 0.05$) was used for multiple comparisons. Surface treatment with 2.5% phosphorylated chitosan solution and 0.5mol / L carbodiimide did not influence dentin wettability ($p > 0.05$). Surface free energy increased only when polar solvent (water) was used. Superficial treatment with 2.5% phosphorylated chitosan promoted demineralization on the dentin surface and increased dentinal tubule mouth. . In experiment 2 the effect of biomodifying solutions, 2.5% phosphorylated chitosan and 0.5 mol / L carbodiimide, on the organic components of eroded dentin by Fourier-transformer infrared spectroscopy (FTIR) (n = 5) in triplicate , and by atomic force microscopy (AFM, n = 2), to investigate surface morphology . Thirty specimens of bovine dentin (4.0x4.0x2.5) were subjected to erosive challenge by immersing in 0.3% citric acid (pH = 3.2) for two hours. The specimens were randomly divided into six groups according to the dentin substrate: sound or eroded and dentin biomodification: no biomodification (control), 2.5% phosphorylated chitosan and 0,5 mol/L carbodiimide. Control and carbodiimide specimens were conditioned with 35% phosphoric acid. Greater interaction differences were observed in the presence of phosphorylated chitosan when comparing biomodified samples with the control; suggesting that this biomolecule is adsorbed in larger amount on the dentin surface when compared to biomodified samples with carbodiimide. In the AFM analysis, the biomodification of healthy and eroded dentin with phosphorylated chitosan promoted superficial demineralization and obliterated dentinal tubules, more predominantly when compared to carbodiimide biomodification. Higher adsorption of phosphorylated chitosan biomolecules on the dentin surface compared to carbodiimide biomolecules.

Keywords: Eroded dentin, phosphorylated chitosan, carbodiimide, wettability, contact angle, AFM and FTIR

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	39
2. PROPOSIÇÃO	47
3. MATERIAL E MÉTODO	51
3.1 Experimento 1	53
<i>Seleção dos dentes</i>	55
<i>Preparo da amostra</i>	55
<i>Formação das lesões de erosão</i>	55
<i>Divisão dos grupos experimentais</i>	56
<i>Tratamento da superfície de dentina</i>	56
<i>Preparo da solução de EDC-HCl</i>	57
<i>Análise da molhabilidade superficial</i>	58
<i>Análise da energia livre de superfície</i>	58
<i>Preparo dos espécimes para MEV</i>	59
<i>Análise Estatística</i>	60
3.2 Experimento 2	60
<i>Delineamento experimental</i>	60
<i>Seleção dos dentes e preparo das amostras</i>	62
<i>Preparo da amostra</i>	62
<i>Formação das lesões de erosão</i>	62
<i>Preparo dos biomodificadores e biomodificação da superfície dentinária</i>	63
<i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	64
<i>Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	64
4. RESULTADOS	67
4.1 Experimento 1	69
4.2 Experimento 2	72
<i>Análise de espectroscopia transformada de Fourier (FTIR)</i>	72
<i>Análise de Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	73
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	89

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O substrato dentinário erodido apresenta alterações histológicas complexas que ocorrem devido à exposição contínua a ácidos; de origem intrínseca ou extrínseca (Lussi & Hellwig., 2006; Grippo., 2012) não provenientes de bactérias orais, o que levará a rápida dissolução do componente mineral da dentina (Lussi et al.,2011), podendo ocasionar dor e desconforto em resposta a uma hipersensibilidade dentinária (Barbour et al. 2011; West et al., 2013). Preparações da dentina com AAMPs (peptídeos anfipáticos e antimicrobianos) é uma nova abordagem versátil com potencial para fortalecer as interfaces baseadas em adesivos vulneráveis (Moussa DG et al.,2019), sustentando que tratamentos de eleição utilizados para o restabelecimento dos tecidos dentais erodidos baseiam-se em abordagens minimamente invasivas (Attin & Wegehaupt, 2014).

O processo erosivo proporciona inicialmente dissolução da dentina peritubular e aumento do diâmetro dos túbulos, o que pode levar a desmineralização da dentina intertubular com exposição da matriz orgânica, resultando em uma superfície porosa e com rugosidades (Meurman et al.,1991; Ten Cate.,1996; Ganss et al., 2009b). Além da dissolução mineral, a degradação enzimática das fibras colágenas (Schlueter et al., 2010) podem interferir na qualidade da rede de colágeno (Sabatini, 2014) o que reflete diretamente no sucesso das restaurações com compósitos . Estudo recente (João-Souza SH., 2019), que analisou o efeito de cremes dentais dessensibilizantes e / ou anti-erosivos sobre a permeabilidade dentinária ,demonstrou que os cremes dentais tiveram impactos diferentes na permeabilidade da dentina, sugerindo um efeito variável no tratamento da hipersensibilidade dentinária.

Análise sobre os efeitos dos agentes de reticulação de colágeno nas propriedades nanomecânicas e adesivas da dentina erodida por 24 hs e 2 anos após o armazenamento da água , em molares humanos que foram erodidos por refrigerante ou ácido cítrico e tratados com primers contendo proantocianidinas e riboflavina, demonstraram que os agentes de reticulação melhoraram os resultados e mantem as propriedades de adesão da dentina e as nanomecânicas , sem comprometer a polimerização adesiva (Siqueira et al., 2019). O uso de produtos (enxaguatórios bucais e dentifrícios) contendo estanho, independentemente da ordem de aplicação, apresentou efeitos anti-erosivos, na superfície da dentina,

superiores, quando comparados com a superfície de esmalte (Machado et al., 2019). A dentina possui metaloproteinases matriz (MMPs), que são uma classe de colagenases zinco e cálcio-dependentes, que tem como função regular o metabolismo dos tecidos que contém colágeno (Chaussain-Miller et al., 2006) e que conseqüentemente, são capazes de degradar a matriz orgânica da dentina após a desmineralização (Pashley et al., 2004).

Na tentativa de melhorar a qualidade e longevidade de restaurações adesivas, estudos avaliaram a utilização de biopolímeros como a quitosana, para aumentar o número de ligações cruzadas entre as fibras colágenas e neutralizar as MMPs (Shrestha et al., 2011; Xu et al., 2011 Fawzy et al., 2013; Profeta et al., 2012; Ekambaram et al., 2015; Shaffel et al., 2016), melhorando a resistência mecânica do colágeno(Bedran-Russo et al., 2007;Sherestha et al.,2011), principal componente da dentina, uma vez que, este biopolímero é capaz de produzir em matrizes proteicas, como a das fibras colágenas, arranjos microfibrilares (Majeti e Kumar., 2000) com propriedades mecânicas superiores (Dash et al., 2011),; e aumentar a resistência à degradação hidrolítica e enzimática das fibrilas colágenas, utilizadas como suporte para o estabelecimento das interfaces adesivas (Muzzarelli et al., 1973; Bedran-Russo et al., 2014; Scheffel et al., 2014a; Tjäderhane, 2015).

Estudos que avaliaram a remoção seletiva da lesão de cárie, com o uso do laser de ER:YAG, seguido da biomodificação com quitosana , demonstraram redução de 50% da resistência adesiva à dentina desmineralizada, após o armazenamento de água , sem influenciar a perda de massa seca e liberação de Hidroxiprolina (Curylofo-Zotti FA et al.,2019) além de demonstrar que a biomodificação com quitosana , não influencia a composição estrutural e química da dentina residual afetada por cárie (Curylofo-Zotti FA et al., 2017). Estudo que avaliou a molhabilidade da dentina erodida, biomodificada com quitosana 2,5% e 5,0%, independente de sua concentração não apresentou nenhuma influência na molhabilidade da dentina erodida (Ururahy MS et al.,2017).

A quitosana é um biopolímero obtido por meio de desacetilação alcalina da quitina (Muzzarelli, 1973; Rinaudo, 2004). Com o objetivo de minimizar o tempo e energia gastos durante o processo da extração da quitosana, método de extração ecológica mostrou-se relevante; indicando varias modificações químicas que possibilitam funcionalidade da quitosana além de controlar melhor suas

propriedades físico-químicas, levando á uma gama de diversidade de aplicações da quitosana (Kinidri EL et al., 2018).

A estratégia utilizada de alguns agentes biomodificadores são as ligações cruzadas ou “crosslinks”; as quais consistem na união de duas ou mais moléculas mediante ligações químicas do tipo covalentes. Além de ser biocompatível, a quitosana também apresenta baixa toxicidade aos tecidos, potente atividade antimicrobiana e capacidade quelante (Shrestha et al., 2010; Kishen et al., 2008;). Devido a sua biocompatibilidade e habilidade de estimular a proliferação de fibroblastos, a quitosana tem sido incorporada em “scaffolds” para melhora das propriedades mecânicas e resistência à degradação (Mori et al., 1997; Wang et al., 2003; Tangsadthakun et al., 2007).

O efeito da solução de quitosana seguida da ativação com luz ultravioleta (UVA) após o condicionamento com ácido fosfórico foi verificado previamente ao procedimento restaurador, e constatou-se um aumento da força de adesão imediata (Fawzy et al., 2013). No estudo de Daood et al., 2012, a utilização de quitosana (2,5%) estabilizou a rede de fibrilas de colágeno e promoveu aumento da infiltração da resina na dentina hígida. No entanto, em ambos os estudos, a solução utilizada não era composta puramente de quitosana. Com relação ao aumento da força de adesão imediata e melhora na infiltração do adesivo na dentina hígida, estudos (Rinaudo, 2006; Xu et al., 2011; Elsaka e Elnaghy et al., 2012; Silva et al., 2012; Fawzy et al.,2013 Daood et al.,2013); demonstraram que o tratamento com quitosana foi positivo.

A utilização de 1% de quitosana por 60s, no tratamento da superfície de dentina desmineralizada, antes do condicionamento com ácido fosfórico, possibilitou a retenção de minerais intrafibrilares, reduziu a atividade de proteases endógenas na degradação do colágeno e demonstrou atividade antibacteriana, contribuindo para a durabilidade da interface resina—dentina (Gu et al., 2019).

A incorporação de novos derivados de quitosana através de produtos químicos vem sendo estudada. Essas modificações não mudam o esqueleto funcional da quitosana, mantendo originais suas propriedades físico-químicas e bioquímicas, porém, conferem ao composto novas propriedades relacionadas aos produtos adicionados, sendo os derivados de quitosana fosforilada, materiais indutores de resistência acelerada (Wang et al., 2014;). Várias técnicas de incorporação foram utilizadas, fundamentadas em interesses biológicos e das

propriedades químicas de tais compostos, com ação bactericida e propriedades quelante sendo essas capazes de modificar a solubilidade da quitosana (Jayakumaret al., 2007; Jayakumar et al., 2008).

A utilização da quitosana fosforilada promoveu a deposição de minerais de fosfato de cálcio na superfície da dentina parcialmente desmineralizada proporcionando baixa energia interfacial, o que facilita a remineralização da superfície da dentina. A quitosana fosforilada, além da comprovada capacidade remineralizadora da superfície dentinária, apresentou também, alta capacidade antimicrobiana (Shanmugam et al., 2016), justificando seu estudo no meio odontológico. A utilização de quitosana fosforilada 0,5%, na dentina erodida, demonstrou efeito antierosivo favorável, através da análise de MEV, na manutenção da integridade das fibrilas de colágeno (A. Beltrame.; 2018).

A Carbodiimida (1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] hidroclorito de carbodiimida ou EDC), substância biomodificadora, é um isômero de cianamida, com a capacidade de agregar aminoácidos em peptídeos, sem a incorporação de outros grupos ao processo de ligação. Possui baixa citotoxicidade, com um mecanismo de ação que faz ligações peptídeo-covalentes entre as proteínas, ativando os grupos carbóxilo-livres nos ácidos glutâmico e aspártico presentes nas moléculas proteicas (Bedran-Russo et al., 2010; Scheffel et al., 2014b; Scheffel et al., 2015). Estas ligações de peptídeos covalentes resultam na formação de O-acilisourea que irá reagir com o grupo épsilon amino da lisina ou hidroxilisina presente na cadeia polipeptídica mais próxima e formar ligações amida covalentes (Ekambaram et al., 2015). O único produto residual é a ureia, mas é facilmente eliminado com água. O uso da carbodiimida sobre colágeno dérmico de ovino confere alto grau de ligações cruzadas; por tanto, maior resistência à degradação enzimática quando exposta as colagenases (Daminket al., 1996).

O uso do EDC associado a adesivo autocondicionante (aplicado por 1 min) como pré-tratamento da dentina manteve a força de adesão imediata; além de reduzir ação das MMP-2 e -9, mostrando que o pré-tratamento com o EDC pode melhorar a durabilidade e a integridade estrutural da interface resina dentina (Mazzoni et al.; 2018).

O tratamento da dentina com carbodiimida a 0,5 mol/L foi capaz de prevenir a degradação da interface adesiva resina/dentina após 12 meses, especialmente quando aplicado por 60 segundos, prevenindo a degradação do colágeno frente as

MMPs (Scheffel et al., 2015). Superfície de dentina tratadas com EDC (0,5 M e 1,0 M) por 10 min, demonstrou maior temperatura de desnaturação , que pode ser considerado indicador indireto da rede de colágeno mais resistente e altamente reticulada (Cadenaro et al., 2016).

A carbodiimida exibe vantagens em relação a outros agentes inibidores de atividade proteolítica, pois não atua somente em enzimas, mas também faz ligações cruzadas com as moléculas de colágeno. Outra vantagem seria que esse agente, por ser inespecífico, atua sobre um amplo espectro de enzimas do tipo collagenase (MMPs, catepsinas e outras), não necessitando, portanto, da utilização de diferentes tipos de agentes para cada uma destas enzimas (Sabatini, 2014; Mazzone, 2014).

A ação de agente reticuladores, como o EDC 0,5 mol/L, como crosslinkers na resistência de união de pinos de fibra de vidro em dentina radicular , demonstrou que a biomodificação da dentina com reticulador foi eficaz na prevenção da perda de força de adesão no terço cervical.; assim como a diminuição da atividade gelatinolítica e proteolítica (Alonso et al., 2018). O efeito de 0,3M de EDC na cimentação de pinos de fibras radiculares, mostrou eficácia na preservação da resistência pós-adesão ao longo do tempo, através da redução da atividades das proteases endógenas intra radiculares (Comba. A, et al .; 2019).

Frente às relevantes características das soluções biomodificadoras, quitosana fosforilada e carbodiimida, que aumentam o número de ligações cruzadas entre as fibras colágenas e neutralizam metaloproteinases de matriz (MMPs) e da necessidade de maior durabilidade dos procedimentos restauradores em dentina erodida, torna-se importante avaliar o efeito dessas substâncias na reumidificação da dentina erodida (Bedran-Russo et al., 2007; Shrestha et al., 2011; Profeta et al., 2012; Fawzy et al., 2013).

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo geral avaliar *in vitro* o efeito das soluções biomodificadoras, quitosana fosforilada a 2,5% e carbodiimida a 0,5mol/L na dentina erodida. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a molhabilidade da dentina erodida, através das medidas de ângulo de contato.
- Avaliar a energia livre de superfície, com três solventes orgânicos distintos, através de medidas de ângulo de contato.
- Análise morfológica da superfície biomodificada através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Análise morfológica da superfície biomodificada através de Microscopia de Força atômica (AFM).
- Análise das estruturas químicas da superfície biomodificada através de Espectroscopia Transformada de Fourier (FTIR).

3. Material e Método

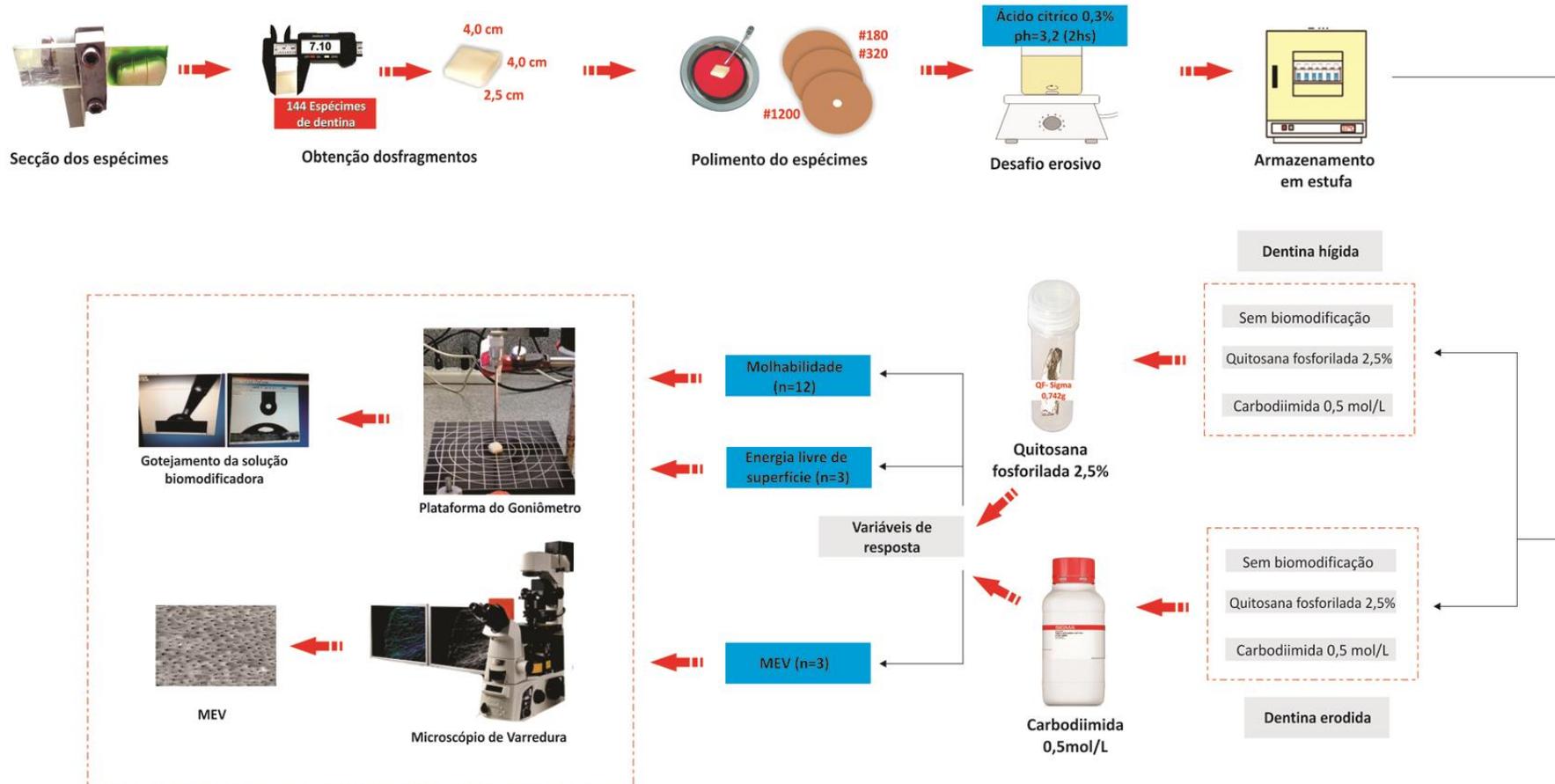
3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Experimento 1

Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram o **tratamento da superfície**, em três níveis: sem biomodificação (controle), solução de carbodiimida 0,5 mol/L, e solução de quitosana fosforilada a 2,5% e o **substrato dentinário**, em dois níveis: dentina hígida e dentina erodida. A amostra do experimento foi composta por cento e quarenta e quatro incisivos bovinos. Sendo setenta e dois dentes para análise da molhabilidade, cinquenta e quatro dentes para análise da energia livre de superfície e dezoito dentes para análise de microscopia eletrônica de varredura. O delineamento foi realizado em blocos completos casualizados. As variáveis de resposta foram: 1) análise quantitativa da molhabilidade da superfície por meio de mensuração do ângulo de contato (θ) formado entre o sistema adesivo e a superfície dentinária (n=12); 2) análise quantitativa da energia livre da superfície, com três solventes orgânicos, com polaridades distintas (n=3); 3) análise qualitativa da morfológica da superfície, por meio de microscopia eletrônica de varredura (n=3). O fluxograma do experimento está ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma do experimento 1.



Seleção dos dentes

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

Preparo da amostra

Os dentes foram seccionados transversalmente na junção amelocementária para separar as coroas das raízes, utilizando disco diamantado (série 15HC 11-4244, Buehler, Illinois, EUA) montado em máquina de corte (Isomet 1000; Buehler, Alemanha). Posteriormente, as coroas dentais foram seccionadas no sentido mésio-distal a fim de obter duas hemi-seções (vestibular e palatina) de cada coroa. Na hemi-seção vestibular foi obtido 1 fragmento de 4 x 4 x 2,5mm de dentina. Os fragmentos foram fixados em matrizes de teflon utilizando-se cera fundida (Kota Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil) com a superfície do esmalte voltada para baixo. Posteriormente, as superfícies de dentina foram polidas em politriz Arotec APL-4 (Arotec S/A Ind. Com, SP, Brasil) refrigerada à água com lixas d'água com granulação de #180 a #320 com a finalidade de remover excessos laterais e acertar o tamanho dos fragmentos, em seguida, para o polimento das superfícies de dentina foi utilizada lixa com granulação #1200 (Hermes AbrasivesLtd., VA, EUA) por 10 segundos, a fim de planificar a superfície de dentina de cada espécime. Por fim, os espécimes foram polidos com pasta de alumina 0.3- μ m (Arotec S/A Ind. Com., SP, Brasil) em feltro polidor (ATM, Altenkirchen, Alemanha) por 5 segundos.

Formação das lesões de erosão

Para induzir a formação das lesões de erosão, foi utilizado protocolo estabelecido por Vanuspong et al., 2002. Cada espécime de dentina foi imerso em 20 mL de ácido cítrico 0.3% (pH=3.) Individualmente e colocados na mesa agitadora (CIEN TEC), e ficaram sob agitação constante numa velocidade de 50 rpm por um período de 2 horas. Após esse período, os espécimes foram lavados com água destilada e armazenados individualmente em Eppendorff contendo saliva artificial por 24 horas em estufa a 37°C. A saliva artificial foi composta por

metilparabeno (2,0 g), carboximetilcelulose de sódio (10,0 g), KCl (0,625 g), MgCl₂.6H₂O (0,059 g), CaCl₂.2H₂O (0,166 g), K₂HPO₄ (0,804 g), e KH₂PO₄ (0,326 g) em 1000 mL de água destilada, conforme protocolo descrito por McKnight-Hanes e Whitford e modificada por Amaechi et al. 1999.

Divisão dos grupos experimentais

Os cento e quarenta e quatro espécimes de dentina foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos conforme ilustrado na Figura 1:

Tratamento da superfície de dentina

Para os espécimes que receberam a biomodificação da dentina, este procedimento foi realizado com solução de quitosana fosforilada a 2,5% (Wang et al 2014). Para o preparo da solução de quitosana fosforilada, foram pesados 2,5 gramas de quitosana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) de baixo peso molecular (75-85% de desacetilação), 5 gramas de ureia e 10mL de ácido fosfórico, os quais serão adicionados a 40mL de solução de dimetilformamida (DMF). A mistura foi agitada a temperatura de 150°C durante 1h. Em seguida, foi filtrada, e o precipitado lavado minuciosamente com água destilada e etanol anidro, e então, seco sob vácuo (Chung et al., 2014; Wang et al., 2014). A mistura foi adicionada lentamente a 100mL de solução de ácido acético a 1%, sob agitação magnética (Marconi Equip. Lab. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) durante 1 hora de agitação (tempo suficiente para solubilizar o polissacarídeo).

Para a biomodificação da superfície com solução quitosana, 20µL da solução de quitosana fosforilada 2,5%, foi aplicada sobre a superfície dentinária, com o auxílio de uma micropipeta, permanecendo sobre a superfície durante 60 seg, em seguida a superfície foi seca com papel absorvente.

Figura 2. Protocolo de aplicação da quitosana fosforilada. A- Armazenamento da quitosana fosforilada 2,5%, B- Apresentação da quitosana fosforilada 2,5%, C- Pesagem, D- Diluição em ácido acético 1%, E- Solução de quitosana fosforilada a 2,5% , F- Medição da solução em micropipeta, G- Gotejamento da solução de quitosana fosforilada a 2,5%; H- Dentina biomodificada com quitosana fosforilada a 2,5%.

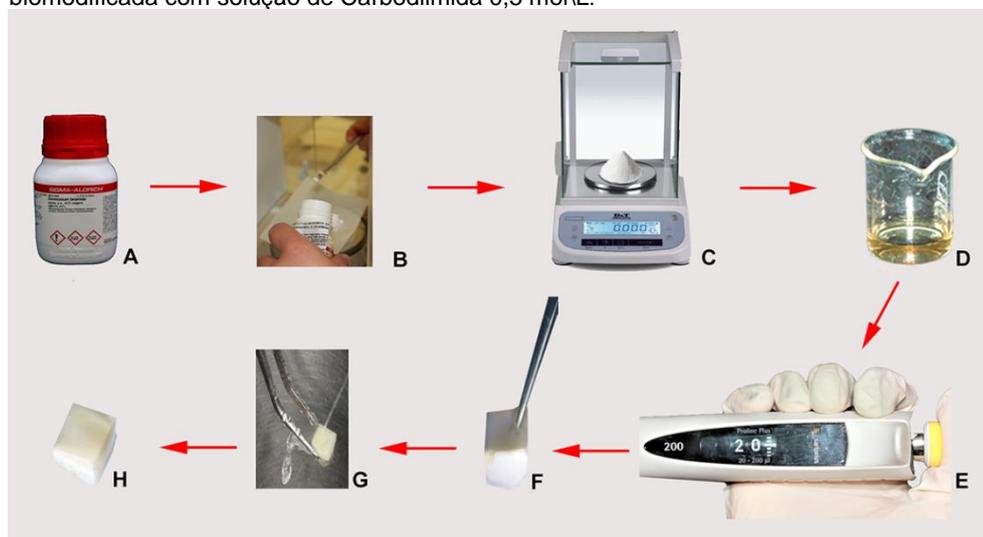


Preparo da solução de EDC-HCl

A solução de EDC-HCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi preparada no momento de ser utilizada. Para conseguir uma concentração de EDC 0,5 mol/L, foi necessário preparar por grupo: 2,3 mg de EDC-HCL diluído em 230 μ l de água Milli-Q; conseguindo-se uma solução com pH 7.34.

Para a biomodificação da superfície com a solução do EDC 0,5 mol/L, 20 μ l da solução de EDC foi aplicado na superfície por 60 seg, em seguida a superfície foi lavada com água destilada por 15 seg e posteriormente seca com papel absorvente.

Figura 3. Protocolo de aplicação da Carbodiimida. A- Apresentação do Hidroclorito de Carbodiimida (EDC-HCL); B- Colocação do pó na balança; C- Pesagem; D- Diluição, E- Micropipeta; F- Gotejamento da solução de Carbodiimida 0,5 mol/L; G- Lavagem; H- Dentina biomodificada com solução de Carbodiimida 0,5 mol/L.



Análise da molhabilidade superficial

A molhabilidade da dentina foi determinada pela medição do ângulo de contato (θ) pelo método da gota séssil, utilizando-se um goniômetro (OCA20 Data Physics Instruments, Alemanha). Cada espécime foi posicionado sobre uma plataforma móvel com parafusos de nivelamento. Em seguida, uma gota de aproximadamente 20 μ L do adesivo (Single Bond Universal, 3M Deutschland, Alemanha) foi dispensada sobre o espécime. Por meio de um sistema de iluminação com lâmpada de tungstênio e uma câmera CCD (Dispositivo de Carga Acoplada), a imagem da gota sobre a superfície dentinária foi captada por um período de 2 minutos, em intervalos de 1ms. Um microcomputador processou a imagem da gota, e a tangente formada entre a gota e a superfície foi ajustada para determinação dos valores de θ com auxílio do software SCA20. Os valores de (θ) foram analisados por meio de um programa específico.

Todos os procedimentos envolvendo a mensuração de θ foram realizados em ambiente fechado e em temperatura ambiente controlada de 25 \pm 1°C.

Figura 4. Esquema representativo da sequência de obtenção de (θ) na análise da Molhabilidade. A- Posicionamento do espécime na plataforma do Goniômetro; B- Gotejamento da solução biomodificadora; C-Término do gotejamento; D- Início da medida; E- Obtenção dos valores de θ .



Análise da energia livre de superfície

Para a análise da energia livre de superfície foram utilizados cinquenta e quatro espécimes, divididos em 6 grupo: dentina hígida e dentina erodida. Foram utilizados três líquidos de polaridades diferentes: água (solvente universal; polar), formamida (polaridade intermediária) e diodometano (altamente apolar).

Os valores obtidos de formamida e de diodometano foram utilizados para o cálculo de energia de superfície e suas componentes, no entanto, para explicar a condição da superfície apenas se faz necessário que se tenha os valores de ângulo de contato da água e os valores de energia de superfície.

Foram realizadas medidas de ângulo de contato pelo método da gota séssil, utilizando-se um goniômetro (OCA20 Data Physics Instruments, Alemanha). Cada espécime foi posicionado sobre uma plataforma móvel com parafusos de

nivelamento. Em seguida, uma gota de aproximadamente 20 μ L de cada líquido, (água, formamida e diodometano) foi dispensada sobre o espécime com o auxílio de uma micropipeta.

A energia livre de superfície (γ_s) foi calculada por meio de valores de θ , entre líquidos de diferentes polaridades e a superfície sólida, utilizando a equação de Owens-Wendt, que divide a energia superficial em suas componentes dispersivas (d) e polares (p).

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2(\gamma_L^d \gamma_s^d)^{\frac{1}{2}} + 2(\gamma_L^p \gamma_s^p)^{\frac{1}{2}}$$

Para cada líquido γ_L e suas componentes dispersivas γ_L^d e polares γ_L^p conhecidas, mede-se o θ entre o mesmo e a amostra. A (γ_s) é dada pela soma de suas componentes polar (γ_s^p) e dispersivas (γ_s^d).

Preparo dos espécimes para MEV

Os fragmentos (n=3), previamente preparados, foram colocados em frascos de Eppendorff com água destilada e foram preparados de acordo com o seguinte protocolo: limpeza em ultrassom (UltrasonicCleaner T-1449-D, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 10 minutos; secagem com papel absorvente; imersão em solução de glutaraldeído a 2,5% tamponado com solução de cacodilato de 9 sódio AA 0,1M com pH 7,4 (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) em temperatura de 4°C por 12 horas; lavagem com água destilada por 3 minutos, seguida de imersão em água destilada por 1 hora, com trocas a cada 20 minutos; desidratação em graus ascendentes de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, SP, Brasil): 25% (20 min), 50% (20 min), 75% (20 min), 95% (30 min), 100% (60 min). Após a desidratação, os espécimes serão imersos em solução de HMDS (Merck KgaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos para secagem química. Todos esses procedimentos foram realizados no interior de uma capela. Depois da secagem, os corpos-de-prova foram fixos em stubs com fita dupla-face de carbono e a cobertura com ouro realizada em aparelho de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, FL9496, Balzers, Liechtenstein). Os espécimes foram levados ao microscópio eletrônico de varredura (Philips XL30 FEG, Eindhoven, Holanda) pertencente ao Laboratório de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP – USP).

Foi realizada a varredura de toda a superfície do espécime e, em seguida fotografada a área mais representativa de cada grupo em único aumento de 1.500X.

Análise Estatística

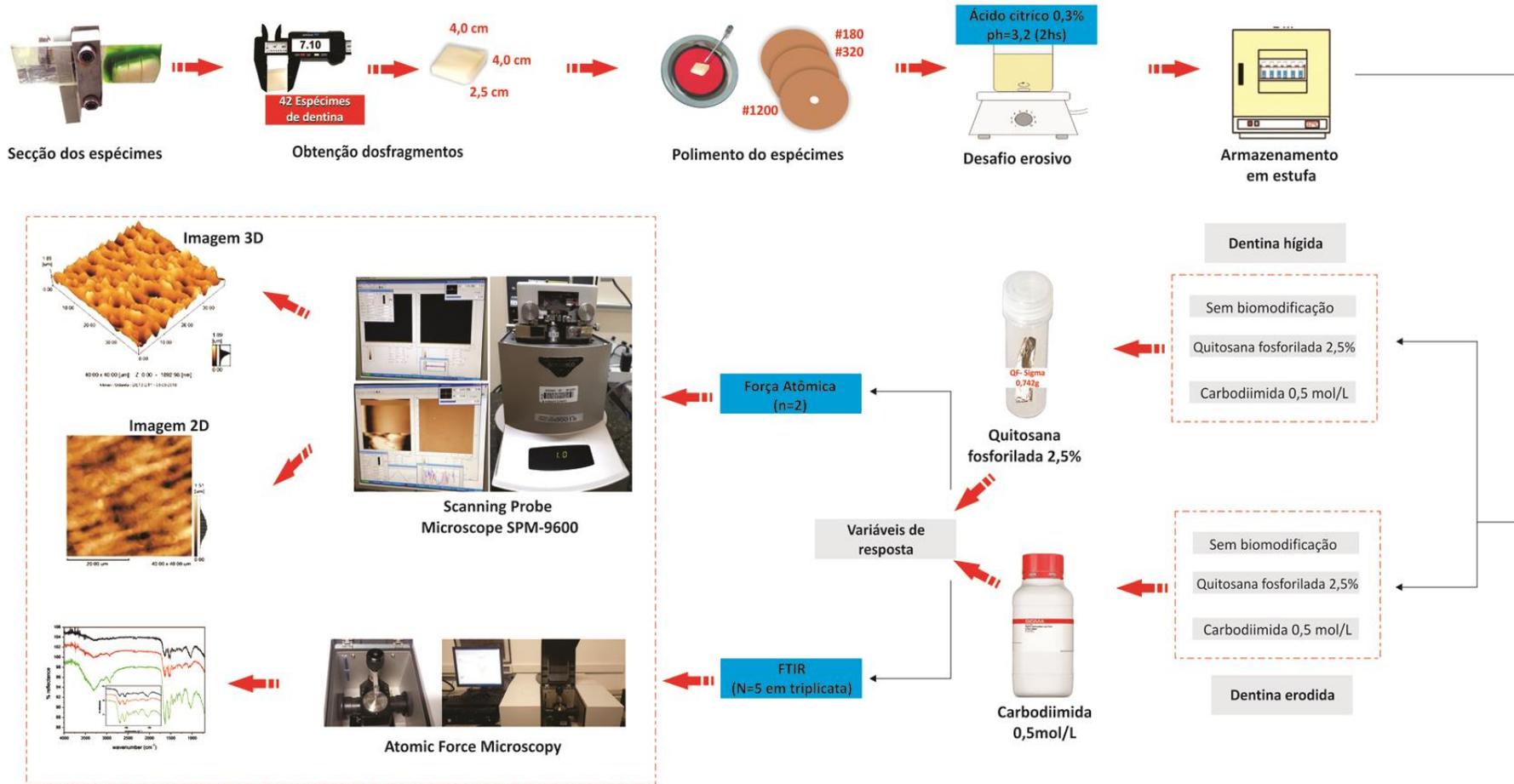
Os valores de (θ), da análise de molhabilidade, foram submetidos ao teste de normalidade, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov com o nível de significância de 5%, e os dados apresentaram-se normal. Posteriormente os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de dois fatores: Tratamento superficial e a interação entre eles com nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS para Windows, versão 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.2 Experimento 2

Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram divididos de acordo com o *tipo de substrato*, em dois níveis: hígido e erodido, e de acordo com a biomodificação da dentina, em três níveis: sem biomodificação (controle), quitosana fosforilada e carbodiimida (EDC). A amostra foi composta por 60 incisivos bovinos divididos aleatoriamente em 6 grupos. As variáveis de resposta foram análise qualitativa dos picos de absorção do fosfato, grupos carbonato e bandas da matriz orgânica por meio de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, n=5 em triplicata) e análise qualitativa da morfologia da superfície por meio de microscopia de força atômica (AFM, n=2). O fluxograma do experimento (2) está ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Fluxograma do experimento 2.



Seleção dos dentes e preparo das amostras

Incisivos bovinos recém-extraídos foram lavados em água corrente e examinados macroscopicamente com auxílio de lupa estereoscópica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) em aumento de 20X. Foram selecionados 72 dentes que não apresentaram linhas de fratura ou fissuras profundas na coroa.

Preparo da amostra

Os dentes foram seccionados transversalmente na junção amelocementária para separar as coroas das raízes, utilizando disco diamantado (série 15HC 11-4244, Buehler, Illinois, EUA) montado em máquina de corte (Isomet1000; Buehler, Alemanha). Posteriormente, as coroas dentais foram seccionadas no sentido méso-distal a fim de obter duas hemi-seções (vestibular e palatina) de cada coroa. A partir da hemi-seção vestibular foi obtido um espécime de 4 x 4 x 2,5 mm de dentina (para todas as análises).

Os espécimes foram fixados em matrizes de teflon utilizando-se cera fundida (Kota Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil). Em seguida, as superfícies de dentina foram polidas em politriz (Arotec APL-4, Arotec S/A Ind. Com, SP, Brasil) refrigerada à água com lixas d'água com granulação de #180 a #320 com a finalidade de remover excessos laterais e acertar o tamanho dos espécimes, em seguida, o polimento das superfícies de dentina foi realizado com lixa de granulação #1200 (Hermes AbrasivesLtd., VA, EUA) por 10 segundos, a fim de planificar a superfície de dentina de cada espécime. Por fim, os espécimes foram polidos com pasta de alumina 0.3 μ m e 0.05 μ m (Arotec S/A Ind. Com., SP, Brasil) em feltro polidor (ATM, Altenkirchen, Alemanha) por 60 segundos.

Formação das lesões de erosão

Para induzir a formação das lesões de erosão, foi utilizado protocolo estabelecido por Vanusponget al., 2002. Cada espécime de dentina foi imerso em 20 mL de ácido cítrico 0.3% (pH=3.2) individualmente, e em seguida, colocado em mesa agitadora (CIEN TEC-CT155) na qual permaneceu sob agitação constante, numa velocidade de 50 Rpm, por um período de 2 horas. Após esse período, os espécimes foram lavados com água destilada e armazenados individualmente em tubos contendo saliva artificial por 24 horas em estufa a 37 °C. A saliva artificial foi composta por metilparabeno (2,0 g), carboximetilcelulose de sódio (10,0 g), KCl

(0,625 g), MgCl 2.6H₂O (0,059 g), CaCl₂.2H₂O (0,166 g), K₂HPO₄ (0,804 g), e KH₂PO₄ (0,326 g) em 1000 mL de água destilada, conforme protocolo descrito por McKnight-Hanes e Whitford, 1994 e modificada por Amaechi et al., 1999.

Preparo dos biomodificadores e biomodificação da superfície dentinária

Para os espécimes que receberam a biomodificação da dentina, este procedimento foi realizado com solução de quitosana fosforilada a 2,5%. Para o preparo da solução de quitosana fosforilada, foram utilizados 2,5 gramas de quitosana (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) de baixo peso molecular (75-85% de desacetilação), 5 gramas de ureia e 10 mL de ácido fosfórico, os quais foram adicionados a 40mL de solução de dimetilformamida (DMF). A mistura foi agitada a temperatura de 150°C durante 1h. Em seguida, foi filtrada, e o precipitado lavado minuciosamente com água destilada e etanol anidro, e então, seco a vácuo (Chung et al., 2014; Wang et al., 2014). A mistura foi adicionada lentamente a 100 mL de solução de ácido acético a 1% so agitação magnética (Marconi Equip. Lab. Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) durante 1 hora de agitação (tempo suficiente para solubilizar o polissacarídeo). Para a biomodificação da superfície com solução de quitosana, 20µL da solução foi aplicada sobre a superfície dentinária, com o auxílio de uma micropipeta, permanecendo sobre a superfície durante 60 segundos, em seguida, a superfície foi seca com papel absorvente.

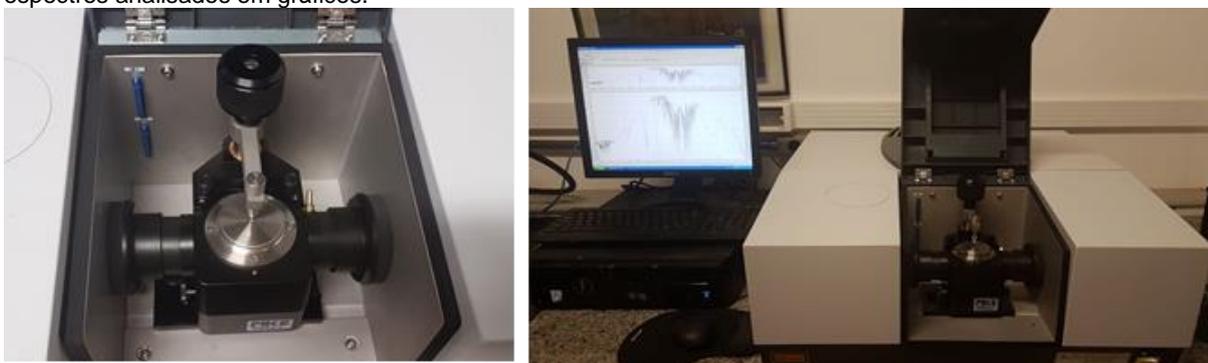
A solução de EDC-HCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi preparada no momento de ser utilizada. Para obtenção uma concentração de EDC 0,5 mol/L, 2,3 mg de EDC-HCL diluído em 230 µl de água milli-q; conseguindo-se uma solução com pH 7.34. Para a biomodificação da superfície com a solução do EDC 0,5 mol/L, 20µL da solução de EDC foi aplicado na superfície por 60 segundos, em seguida, a superfície foi lavada com água destilada por 15 segundos e seca com papel absorvente.

Os espécimes do grupo controle receberam o condicionamento da dentina com ácido fosfórico a 35% (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) por 15 segundos, seguido de lavagem com água destilada pelo mesmo tempo e secagem com papel absorvente.

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Trinta espécimes (n=5) foram destinados à análise de espectroscopia de reflexão total atenuada na superfície na região do infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR), utilizando-se um espectrofotômetro (FTIR IR-Prestige21, Shimadzu, Japão, Kyoto). Os espécimes de dentina foram mantidos em água destilada a 4°C até a realização das medidas no espectrômetro. A análise foi realizada previamente e após os tratamentos com os biomodificadores. Para tal, a superfície de dentina foi posicionada sobre um detector de ATR (Atenuated Total Reflectance) de diamante de 2 mm (Durascope, SmithsDetection, EUA), acoplado em espectrômetro de transformada de Fourier (FTIR IR-Prestige 21, Shimadzu, Japão, Kyoto). Foram analisados os picos de absorção do fosfato (entre 900 e 1200 cm^{-1}), grupos carbonato ($\sim 872 \text{ cm}^{-1}$) e bandas da matriz orgânica (1284 cm^{-1} , 1238 cm^{-1} e 1203 cm^{-1}). A partir de cada espécime foram realizadas três leituras (triplicata), gerando assim 3 espectros de absorção para cada espécime, obtendo-se um valor médio das três leituras realizadas (Almeida, 2011).

Figura 6. A- Esquema do delineamento da obtenção dos espectros de FTIR. A- Posicionamento do espécime na plataforma do IR-Prestige 21; **B-** Processamento da leitura da amostra de dentina, e impressão dos espectros analisados em gráficos.

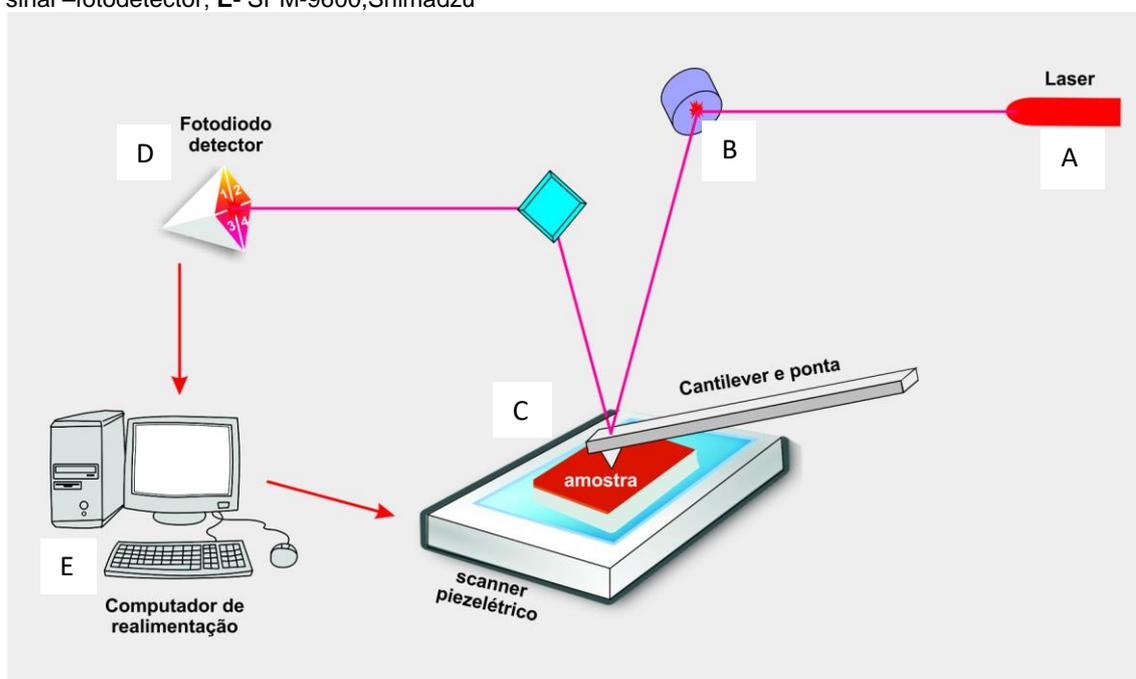


Microscopia de Força Atômica (AFM)

Cada amostra de dentina, previamente tratada, foi submetida à análise de AFM (Atomic Force Microscopy). Individualmente, cada amostra foi fixada a um suporte magnético e posicionada em um scanner piezoelétrico do aparelho (Scanning Probe Microscope, SPM-9600, da Shimadzu), responsável pela movimentação da amostra em todas as direções. A varredura foi realizada no modo contato, onde a ponta de prova (tip) fica em contato permanente com a amostra. A alavanca (cantilever) que suporta a ponta sofre deflexão devido às forças de

interações repulsivas entre a ponta e a superfície da amostra. Esta deflexão é monitorada por um laser de diodo (de 650 nm de comprimento de onda e potência máxima de 1 mW), que incide em um fotodetector. Para a varredura dessas amostras foram utilizadas pontas OMCL-TR800PSA, da Olympus, com as seguintes especificações: formato triangular, frequência de ressonância de 24 kHz, constante de mola de 0,15 N/m e velocidade de varredura variando de 0,5 a 1 Hz. A varredura de cada amostra teve variação até 40 min.. As imagens foram geradas a partir do processamento do sinal que chega ao fotodetector.

Figura 7. Esquema representativo do processamento da imagem da força atômica (AFM). A- Laser de diodo 650nm/1Mw; B- Espelho; C- Ponta da alavanca (tip) OMCL-TR800PSA; D- Processamento do sinal –fotodetector; E- SPM-9600,Shimadzu



4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1

Os dados obtidos na análise da molhabilidade por meio da medição do menor ângulo de contato estão descritos na tabela 1.

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

Tratamento da superfície	Superfície dentinária	
	Hígida	Erodida
Sem Biomodificação	26.15 ± 2.88 Ba	27.83 ± 3.40 Ba
Quitosana fosforilada	33.93 ± 2.28 Aa	36.17 ± 3.70 Aa
Carbodiimida	26.77 ± 3.24ABa	32.89 ± 3.84Aba

Letras minúsculas iguais não diferem entre si entre as superfícies do mesmo tratamento

A ANOVA revelou que não houve interação significativa entre a biomodificação da superfície e o substrato dentinário ($p > 0,05$). As médias do menor ângulo de contato variaram entre 26,15 graus, para o grupo controle até 36,17 graus para a quitosana fosforilada 2,5%.

Na tabela 2 estão descritas as médias com desvio padrão do ângulo de contato obtidas em dentina hígida e dentina erodida e os valores da energia livre de superfície calculados.

Tabela 2. Médias e desvios padrão dos ângulos de contato (Θ) apresentados pelo solvente universal e valores obtidos da energia livre de superfície (γ_s) tal como suas componentes dispersiva (γ_s^d) e polar (γ_s^p) para dentina hígida.

Tratamento da Superfície	Superfície Dentinária					
	Hígida			Erodida		
Sem Biomodificação	49,23 ± 0,95 Aa	32,82 ± 0,99 Aa	16,41 ± 1,02 Ab	46,12 ± 2,70 Aa	20,63 ± 2,06 Ab	25,49 ± 2,96 Aa
Quitosana fosforilada 2,5%	45,94 ± 3,40 Aa	20,94 ± 5,68 Aa	22,00 ± 2,89 Aa	45,24 ± 1,65 Aa	13,18 ± 4,87 Aa	32,06 ± 4,27 Aa
Carbodiimida 0,5 mol/L	48,52 ± 1,69 Aa	28,32 ± 2,79 Aa	20,20 ± 2,29 Aa	39,01 ± 2,15 Ab	23,91 ± 1,66 Aa	15,10 ± 1,30 Ba

Letras maiúsculas e minúsculas não indicam diferença entre superfícies submetidas ao mesmo tratamento.

Com base no resultado apresentado da tabela 2, pode-se observar que a biomodificação com carbodiimida 0,5 mol/L diminui a energia livre da superfície da dentina erodida em relação ao grupo que não foi submetido à biomodificação (Tabela 2). As médias da energia livre de superfície, variaram de 39,01 mJ.m² para o grupo modificado por carbodiimida a 49,23 mJ.m² para o grupo sem biomodificação. A partir dos resultados obtidos na tabela 2, observa-se que a biomodificação com

quitosana fosforilada 2,5% promoveu um aumento do ângulo de contato e uma diminuição da energia livre de superfície.

A figura 8 exemplifica a medição dos ângulos de contato após gotejamento.

Figura 8. Esquema representativo das medidas do ângulo de contato nos grupos após biomodificação superficial: (A) Dentina Hígida e (B) Dentina Erodida.

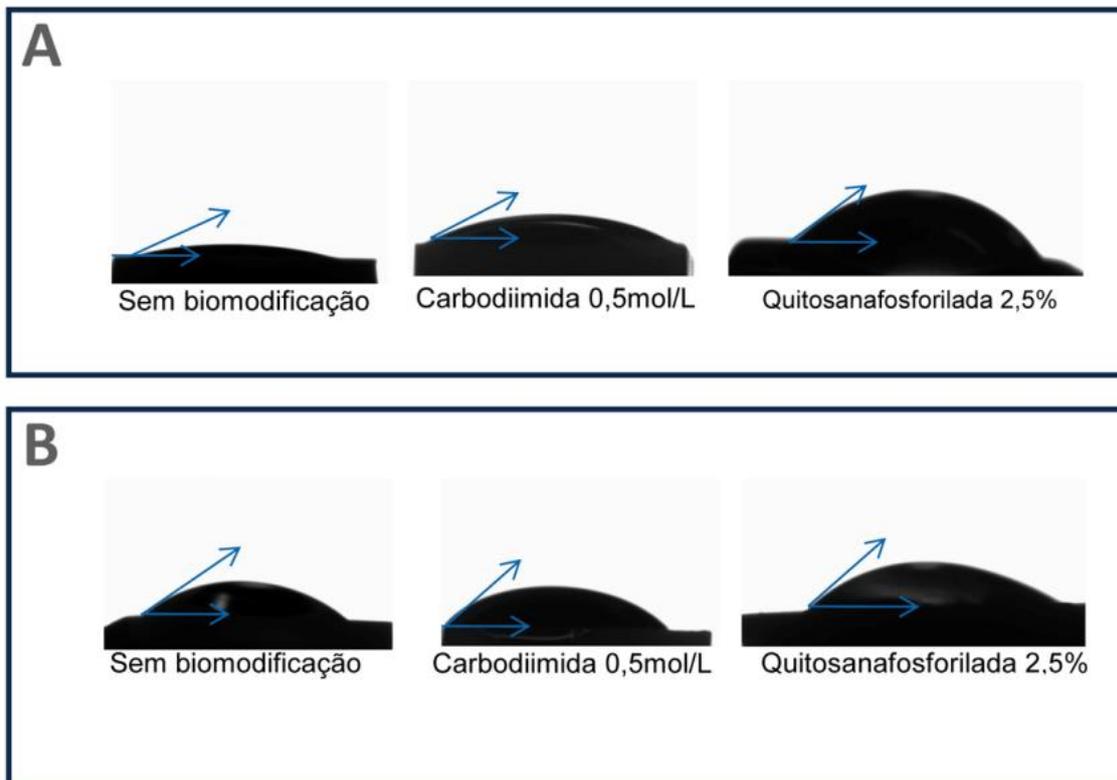
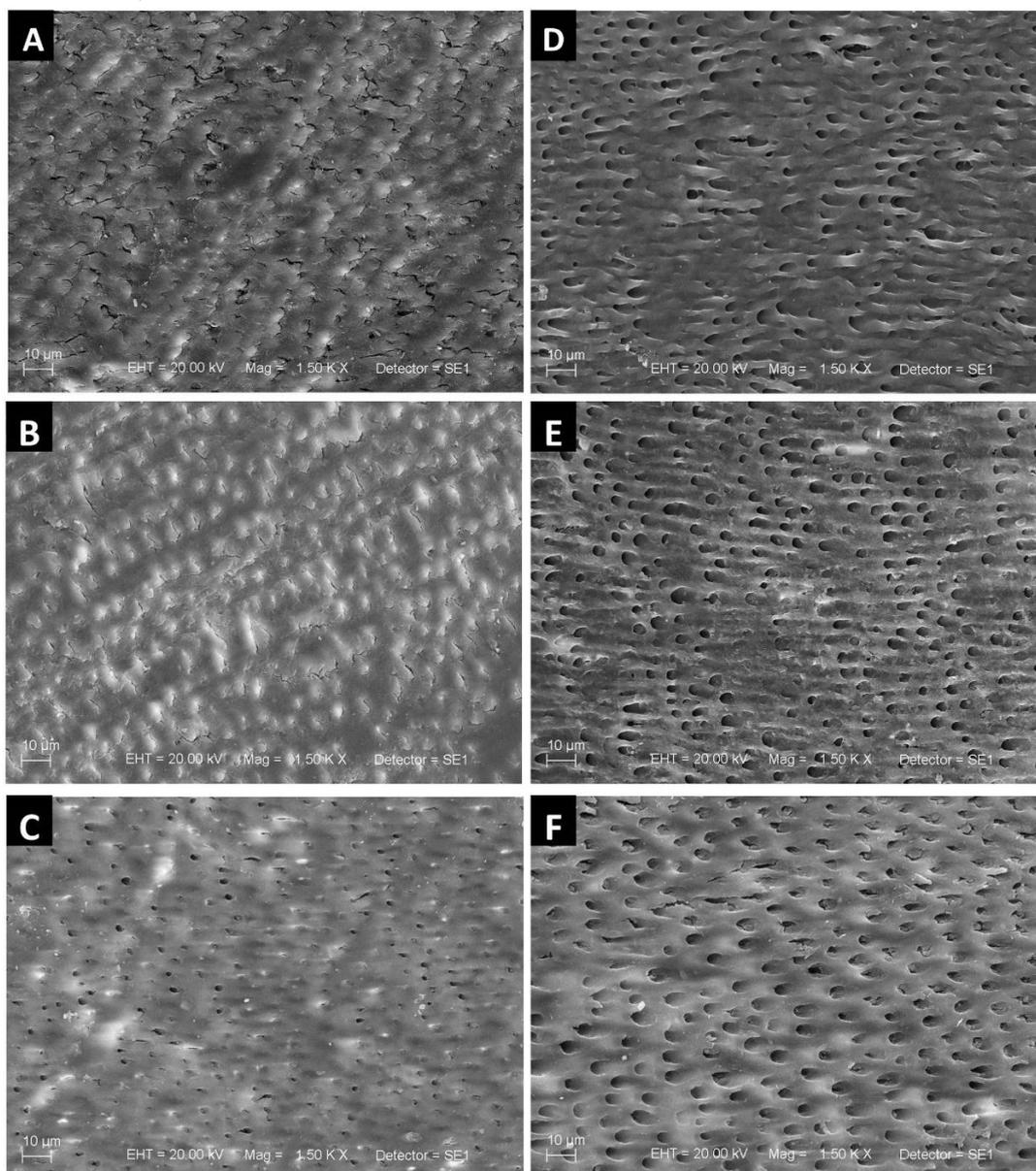


Figura 9. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura da dentina hígida (A, B e C) e Erodida (D, E e F). (A e D). Sem biomodificação (controle). (B e E) Carbodiimida 0,5mol/L (C e F) Quitosana fosforilada 2,5%.



Na Figura 9, as imagens de microscopia eletrônica de varredura representam as amostras de dentina hígida e erodida após a biomodificação da dentina. Na dentina hígida, há presença da smear layer, com túbulos dentinários ocluídos por aposição de dentina peritubular e deposição irregulares de minerais na dentina intertubular(moldes escleróticos) (Imagem A). Após a biomodificação com carbodiimida, os túbulos dentinários permaneceram obliterados. A biomodificação

com quitosana fosforilada proporcionou remoção da smear layer e túbulos dentinários parcialmente visíveis (Imagem C).

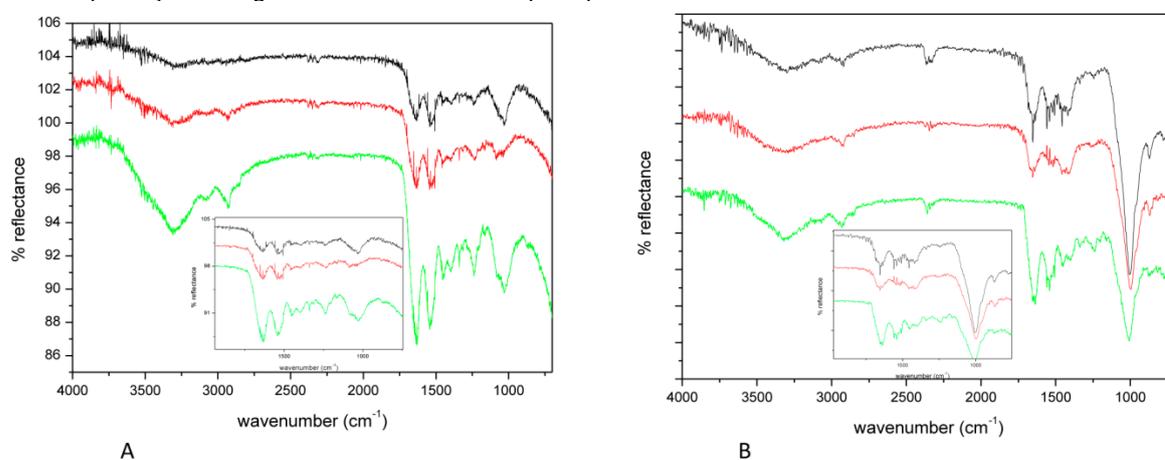
Na dentina erodida, verifica-se uma superfície com matriz orgânica desmineralizada, sem *smear layer* e com túbulos dentinários abertos (Imagem D). O tratamento superficial com carbodiimida promoveu um padrão de desmineralização semelhante ao encontrado no grupo sem biomodificação (controle), porém com a embocadura dos túbulos dentinários ligeiramente aumentada (Imagem E). O tratamento superficial com quitosana fosforilada promoveu desmineralização na superfície e aumento da embocadura dos túbulos dentinários, possivelmente devido a maior remoção de dentina peritubular (Imagem F).

4.2 Experimento 2

Análise de espectroscopia transformada de Fourier (FTIR)

Após as biomodificações, em 2800 cm^{-1} observa-se bandas de C-H presentes na estrutura de quitosana fosforilada e carbodiimida relacionadas aos grupos CH_3 desses compostos orgânicos. Após a biomodificação com quitosana fosforilada, as principais diferenças são encontradas na região entre 1600 e 1000 cm^{-1} , ampliadas na Figura 1. Em 1519 cm^{-1} , observa-se banda com alta intensidade, correspondentes às vibrações do grupo N-H da quitosana. Além disso, o pico pouco intenso em 3080 cm^{-1} , também associado à vibração do grupo N-H, pode ser identificado de maneira mais evidente na amostra erodida. Comparando-se as amostras biomodificadas com o grupo controle, nota-se que maiores diferenças são observadas em presença de quitosana fosforilada. Sugere-se, desta forma, que esta biomolécula esta adsorvida em maior quantidade na superfície dentinária quando comparada a EDC.

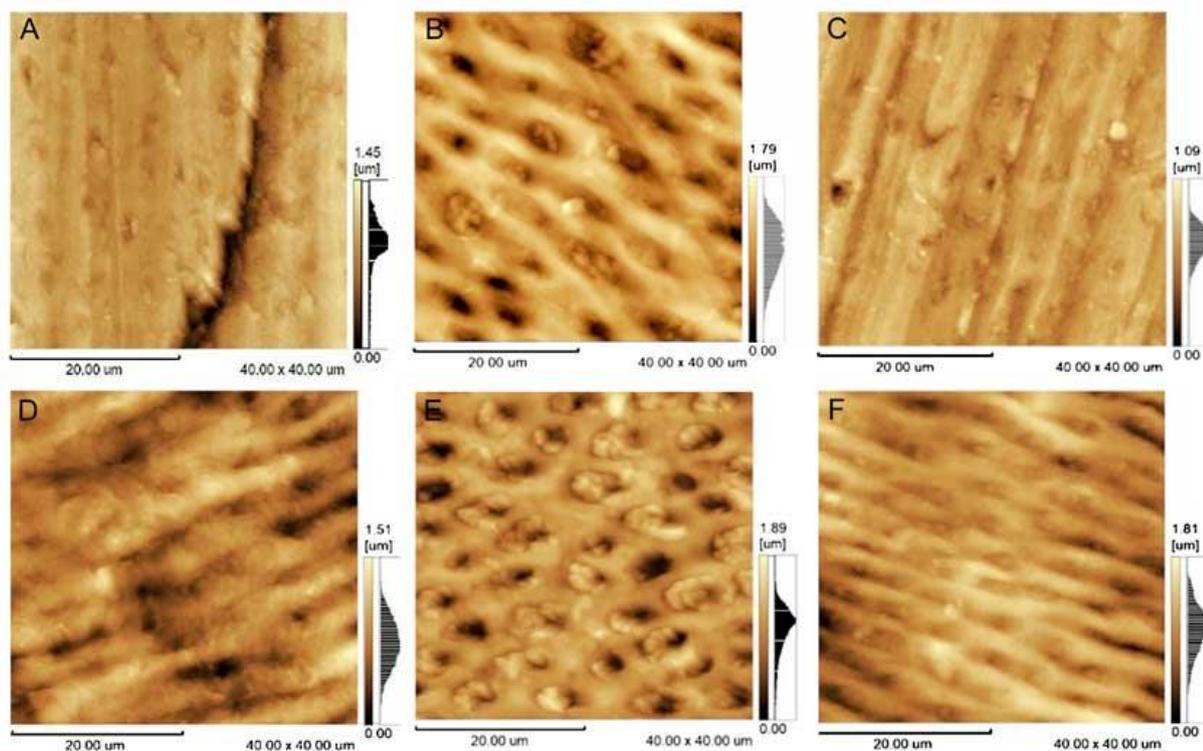
Figura 10. Espectro de FTIR-ATR. Em (A) DH e (B) DE. Dentina hígida = linha preta. Dentina erodida = linha preta. Dentina biomodificada com EDC= linha vermelha e com P-chi= = linha verde. A inserção mostra a amplificação da região contendo as bandas principais.



Análise de Microscopia de Força Atômica (AFM)

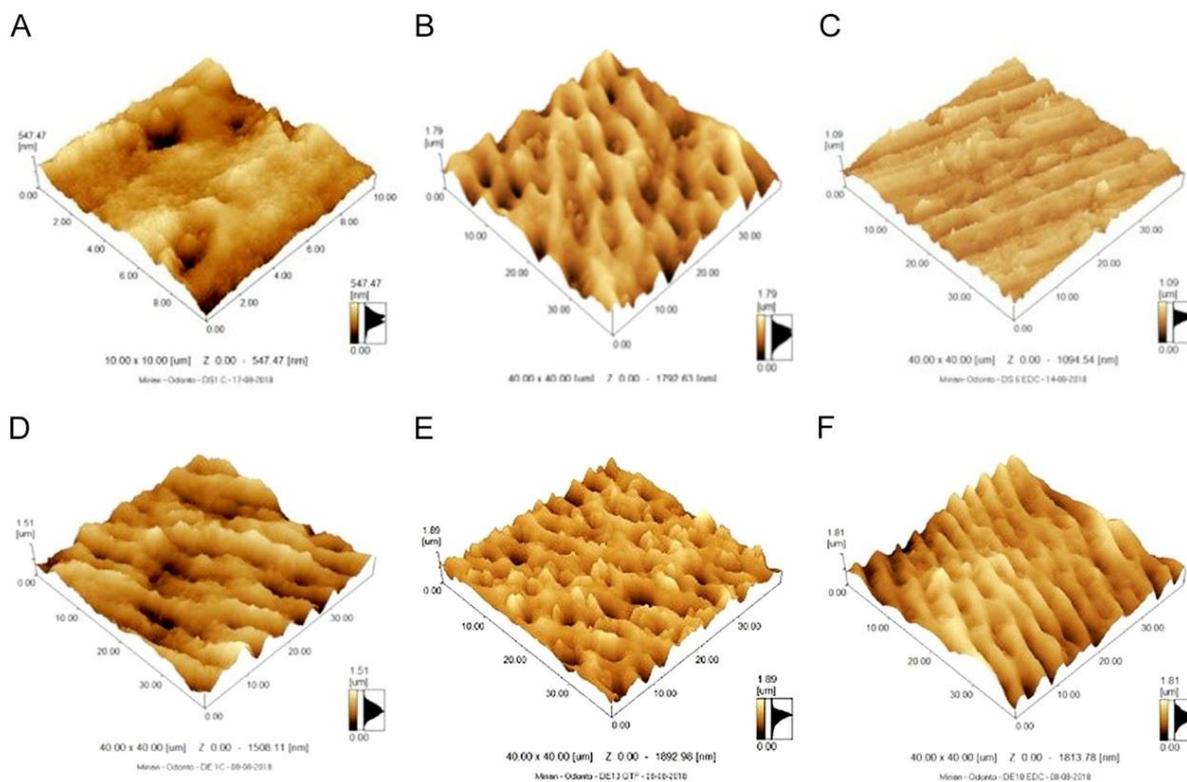
As imagens de microscopia de força atômica demonstram um substrato mais irregular com túbulos dentinários ligeiramente mais abertos na dentina erodida quando comparada com a dentina hígida (Imagens 11A e 11D). A biomodificação da dentina hígida e erodida com quitosana fosforilada promoveu remoção de dentina intertubular compatível com uma desmineralização superficial e túbulos dentinários obliterados pela deposição deste biopolímero (Imagens 11B e 11E). Após biomodificação com EDC foram encontrados túbulos dentinários totalmente obliterados para dentina hígida (Imagem 11C) e na dentina erodida houve obliteração dos túbulos, mas sem deposição sobre a dentina intertubular (Imagens 11F).

Figura 11. Imagens de microscopia de força atômica. A – Dentina hígida sem biomodificação; B – Dentina hígida após biomodificação com quitosana fosforilada; C – Dentina hígida após biomodificação com EDC; D – Dentina erodida sem biomodificação; E – Dentina erodida após biomodificação com quitosana fosforilada; F – Dentina erodida após biomodificação com EDC.



Com relação à análise de rugosidade, as superfícies de dentina que receberam biomodificação quitosana fosforilada e carbodiimida apresentaram maior diferenciação de picos e vales resultando em superfície mais irregular ($R_a = 232,583$ e $R_a = 203,407$; $R_a = 203,4$ e $R_a = 212,556$, respectivamente) quando comparadas aos grupos controle, tanto para dentina hígida quanto para dentina erodida ($R_a = 181,0$ para ambos).

Figura 12. Imagens de microscopia de força atômica em 3D. **A** – Dentina hígida sem biomodificação; **B** – Dentina hígida após biomodificação com quitosana fosforilada; **C** – Dentina hígida após biomodificação com EDC; **D** – Dentina erodida sem biomodificação; **E** – Dentina erodida após biomodificação com quitosana fosforilada; **F** – Dentina erodida após biomodificação com EDC. DH =fotomicrografias da dentina hígidas. DE = fotomicrografias da dentina erodida.



5. Discussão

5 DISCUSSÃO

A biomodificação da matriz dentinária melhora suas propriedades bioquímicas e biomecânicas trazendo benefícios aos tratamentos restauradores (Bredan-Russo.,2010). O emprego de solução de quitosana na dentina tem apresentado resultados favoráveis em relação remineralização da estrutura exposta da dentina desmineralizada (Carpio-Perochena et al., 2015). O uso da quitosana se mostra efetivo devido à sua capacidade de formar ligações cruzadas com colágeno tipo I da dentina que proporciona uma proteção à degradação enzimática (Kishen et al., 2016). Além dos benefícios já demonstrados, e em função das características da quitosana, a incorporação de novos derivados de quitosana através de produtos químicos, vêm sendo estudados. De forma semelhante, a biomodificação com carbodiimida melhora a estrutura do colágeno e a adesão à mesma, através da inativação da MMPs dentinárias (Bax et al., 2016; Mazzoni et al., 2014).

A partir dos resultados obtidos no experimento 1, pode-se concluir que o tipo de substrato dentinário (hígido e erodido) e o tratamento da superfície com quitosana fosforilada a 2,5% e carbodiimida não influenciou na molhabilidade da dentina erodida. Esse resultado vai ao encontro de outros obtidos em estudos anteriores em que também não foi observada diferença estatisticamente significativa na molhabilidade com biomodificação com quitosana em diferentes concentrações (Ururahy et al., 2017). Porém, a biomodificação não influenciar a molhabilidade da superfície dentinária é algo favorável pois a adesão depende do escoamento do sistema adesivo sobre a superfície. Com isso, conseguiríamos os efeitos positivos da quitosana (propriedade antimicrobiana e quelante) sem prejuízos à adesão.

O tipo de substrato dentinário (hígido e erodido) e o tratamento da superfície com Carbodiimida e quitosana fosforilada 2,5% , não influenciou na energia livre de superfície.

A energia livre de superfície total é a resultante da soma de suas componentes, polar e dispersiva. Modificações nessas componentes resultam em diferentes interações entre a superfície e o líquido (biomodificador). Sabendo que uma maior energia superficial de uma determinada superfície indica que ela tem uma maior propensão a participar de reações químicas, e, no que diz respeito a um meio biológico, apresenta uma maior propensão de incorporar biomoléculas nessa superfície. A componente dispersiva favorece interações do tipo de London entre as

moléculas apolares. Esta interação molecular pode ser chamada também de dipolo-induzido ou Forças de Van der Waals (é a interação mais fraca de todas e ocorre entre moléculas apolares). A componente polar favorece interações do tipo eletrostáticas, metálicas e dipolares (Nojiri et al., 2015). Fatores importantes que contribuem para a interação total incluem força eletrostática, co-adsorção de ânions, forças de dispersão e trocas nas propriedades hidrofílicas, incluindo a polaridade e forças de união de hidrogênio entre a superfície e a proteína (Yoshida et al., 2015).

A energia livre de superfície está relacionada com os grupos químicos presentes na superfície das amostras e conseqüentemente, com o tipo de interações moleculares superficiais. Estas irão determinar seletivamente como os grupos polares e apolares de proteínas irão interagir com as diferentes superfícies (hígida e erodida; modificada ou não). Com base nos resultados encontrados no experimento 1, verificou-se (tabela 2) que a biomodificação superficial com Carbodiimida 0,5 mol/L promoveu uma diminuição na energia livre, com a diminuição de sua componente polar. Neste caso, a diminuição da energia livre se deve à diminuição da componente polar e a um ligeiro aumento da componente dispersiva, indicando um aumento da afinidade da superfície por substâncias apolares, após a biomodificação com o EDC. Do ponto de vista químico, o fato de o EDC ter apresentado uma maior afinidade no substrato erodido que pelo sadio, pode ser associado às interações do tipo ligação de hidrogênio entre o EDC e o substrato erodido. O tratamento do substrato dentinário com ácido diluído (no caso, ácido cítrico) promove uma hidrólise ácida de moléculas do colágeno em resíduos de aminoácidos, gerando grupos amino (-NH₂) e carboxila (-COOH), que são doadores em ligações do tipo hidrogênio com o Nitrogênio da amina terciária do EDC. Desta forma, o mecanismo de ação do EDC envolveria o colágeno e se daria via interações moleculares. No que diz respeito a maior interação da Carbodiimida 0,5 mol/L com o substrato erodido, também poderia ser explicado, do ponto de vista químico, uma vez que o substrato erodido promoveu uma superfície cheia de hidroxilas (OH), conseqüentemente mais polar , no momento em que coloca-se a solução com Carbodiimida , sua molécula vai se ligar pelo seu lado polar (N) , ficando na superfície sua parte apolar, justificando assim a diminuição da energia livre de superfície pela diminuição de sua componente polar e aumento de sua componente dispersiva.

O mesmo não aconteceria com a molécula da quitosana fosforilada 2,5%, uma vez que essa molécula possui vários grupos polares e mesmo sua molécula se ligando pela parte polar, ainda assim ficará parte polar na superfície, o que justificaria, do ponto de vista de interação química, a não influência da quitosana fosforilada 2,5% na energia livre de superfície. Existe uma interação do tipo íon-íon entre os ânions fosfato da hidroxiapatita e a porção catiônica da quitosana fosforilada (grupo NH_2^+), que se forma quando a quitosana é solubilizada em ácido acético. Em suma, o mecanismo de ação da quitosana fosforilada se dá via interações iônicas e deve envolver a hidroxiapatita. Baseado nessa explicação, podemos afirmar que o tratamento com quitosana fosforilada 2,5% foi mais eficiente, tanto na molhabilidade como na energia livre de superfície, do que o tratamento com Carbodiimida.

Existe uma interação do tipo íon-íon entre os ânions fosfato da hidroxiapatita e a porção catiônica da quitosana fosforilada (grupo NH_2^+), que se forma quando a quitosana é solubilizada em ácido acético. Em suma, o mecanismo de ação da quitosana fosforilada se dá via interações iônicas e deve envolver a hidroxiapatita.

O tipo de substrato (hígido e erodido) e o tratamento da superfície com Carbodiimida e com quitosana fosforilada 2,5% não influenciou na morfologia superficial foi aceita. As imagens da microscopia eletrônica de varredura demonstraram uma maior efetividade do tratamento com quitosana fosforilada a 2,5% na remoção de smear layer e aumento da embocadura dos túbulos dentinários. Tal modificação superficial é favorável, visto que, a quitosana possui atividade antimicrobiana e poderia auxiliar na antissepsia dos túbulos além de facilitar o escoamento do sistema adesivo.

Com relação aos resultados obtidos no experimento 2, de acordo com a utilização de agentes biomodificadores, esses vem demonstrando efeitos positivos na matriz orgânica, melhorando suas propriedades biomecânicas e bioquímicas, com benefícios preventivos e aumento na reticulação de colágeno (Bredan-Russo 2011; Ururahy et al., 2017; Gu et al., 2018; Beltrame et al., 2018). Além disso, a quitosana fosforilada têm demonstrado bom potencial anti-erosivo (Xu et al., 2011), sendo incorporada em cremes dentais por promover aumento do efeito do fluoreto estanhoso, e conseqüentemente, produzir bom efeito anti-erosivo do esmalte (Aykut-Yetkiner et al., 2014). A carbodiimida (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil, EDC) vêm demonstrando eficácia na preservação da resistência de união ao longo do tempo e

na inibição de MMPs ligadas a matriz (Bredan-Russo et al., 2010; Mazzoni et al., 2012 ; Mazzoni et al., 2014; Mazzoni et al.,2018).

A espectroscopia no infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção em que a energia absorvida se encontra na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Esta análise se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico. Esta análise mostra a possibilidade de identificar mudanças químicas no conteúdo da matriz orgânica estudada (Bachmann et al.,2004). Os resultados obtidos no presente estudo por meio de espectroscopia transformada de Fourier (FTIR) demonstram que ao compararmos as amostras de dentina hígida e erodida, maiores diferenças estão relacionadas ao aumento de intensidade de bandas correspondentes a quitosana fosforilada 2,5% na dentina hígida, sugerindo melhor adesão da quitosana nesta superfície. Apesar das duas superfícies possuírem energia livre de superfície (mJ/m) semelhantes, maior componente dispersiva é observada para a dentina hígida. Após a biomodificação com a quitosana fosforilada, redução da componente dispersiva é observada, sugerindo ligação via tais grupos (e.g. acetileno). O aumento na componente polar após a biomodificação com a quitosana fosforilada, mostra a disponibilidade desses grupos (N-H3+), que não foram usados na ligação com a dentina. O mesmo comportamento é observado para a amostra da dentina erodida. Desta forma, podemos afirmar que a superfície com maior carácter dispersivo foi a melhor para ligação com quitosana fosforilada (32,82 mJ/m²).

A banda 1090 cm⁻¹ corresponde ao alongamento assimétrico do grupo fosfato presente na quitosana fosforilada. A presença dessa banda no espectro confirma que a amostra contém quitosana fosforilada e concorda com estudos que caracterizaram a quitosana fosforilada pela análise de FTIR (Wang et al., 2013) (Amaral et al.,2005). O grupo funcional amida apresenta-se suprimido na biomodificação com a Carbodimida, uma vez que esta ativa grupos carboxilos livres em reações com aminas para posterior ligações amidas (Cadenaro M. et al., 2016).

Na análise da dentina erodida pode ser notada a banda característica da amida (bem intensos em 1550,80 ou 1619,57, e em 3313,10). As carbodimidas são

reagentes de acoplamento funcional que induzem grupos de ácidos carboxílicos de resíduos glutâmicos ou de ácido aspártico para formar ligações de amida estáveis com aminas de lisina e hidroxilisina resíduos na presença de NHS.

O AFM é a técnica mais utilizada para caracterizar a superfície dos materiais, uma vez que permite a obtenção de imagens a três dimensões (3 D), permitindo quantificar a rugosidade de superfície numa escala nanométrica (Botta et al., 2008). Assim, a rugosidade superficial é determinada com alta precisão. Diante dos resultados desse estudo, observamos nas imagens 2D (Figura 2A-2F) da análise de Força Atômica (AFM) que a biomodificação da dentina com a quitosana fosforilada 2,5% promoveu deposição deste composto sobre a superfície (dentina interbular) e túbulos dentinários obliterados (dentina peritubular) (Imagens 1B e 1E), o que vem de encontro com estudo prévio que verificou que a quitosana permaneceu depositada na superfície da dentina desmineralizada mesmo após 7 dias de armazenamento em água (Curylofo-Zotti et al., 2019). Já a biomodificação com o EDC promoveu túbulos dentinários totalmente obliterados para dentina hígida (Imagem 1C), e na dentina erodida, houve obliteração dos túbulos, mas não foi observado deposição de partículas de EDC sobre a dentina intertubular (Imagens 1 F). Do ponto de vista químico, uma das explicações para o fato de termos encontrado somente partículas de quitosana fosforilada na superfície (dentina intertubular) e não de EDC, é que a quitosana fosforilada é um polímero, que se agrega e tem como resultado uma molécula grande, o que dificultaria sua total penetração nos túbulos dentinários, permanecendo assim partículas na superfície. Ao contrário do EDC que é uma molécula pequena, o que facilita sua total penetração nos túbulos dentinários (dentina peritubular). Vale ressaltar que quando uma superfície sofre o processo erosivo (desmineralização), ocorre uma redução do conteúdo mineral de cálcio e fosfato e conseqüentemente uma diminuição na energia livre de superfície, uma vez que essa superfície erodida torna-se uma superfície polar. Temos ainda o processo de capilaridade, onde dentro dos poros observa-se uma área superficial elevada, oferecendo vários pontos de ligações nas paredes, que aliado com o menor tamanho da molécula de EDC favoreceria a penetração desse biopolímero modificador no interior dos túbulos dentinários.

A rugosidade superficial é o conjunto das irregularidades microgeométricas que resultam em uma superfície decorrente da interação com os processos de desgaste e que são formados por numerosos sulcos e ranhuras variáveis em forma,

direção e profundidade (Novaski, 1994). O valor de Ra (rugosidade aritmética) é o mais comumente utilizado. A rugosidade aritmética é expressa em micrômetros (μm) e é obtida pela média aritmética entre os picos e vales encontrados dentro de uma linha central ao longo da área avaliada (Teixeira et al., 2005). No presente estudo pode-se observar nas imagens 3D que houve alteração nas superfícies tratadas. As superfícies de dentina que receberam biomodificação com quitosana fosforilada a 2,5% e carbodiimida apresentaram maior diferenciação de picos e vales resultando em superfície mais irregular (com maior rugosidade) quando comparadas aos grupos sem biomodificação, tanto para dentina hígida quanto para dentina erodida. Sabe-se que todo sólido possui certa rugosidade e que essa rugosidade é importante para vários motivos: aumentar a área de superfície para o contato com o adesivo (melhor adesão), auxiliar no aumento da resistência às forças de cisalhamento pela simples presença de projeções perpendiculares às forças de cisalhamento; tende a aumentar adesão mecânica (embricamento) e a penetração do adesivo (restauração) na superfície irregular e nos poros exige uma baixa viscosidade e tensão superficial equilibrada. Dessa forma podemos afirmar que ambos biomodificadores poderiam auxiliar positivamente no processo de adesão das restaurações a superfície dentinária.

6. Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A biomodificação superficial da dentina erodida com substâncias biomodificadoras, quitosana fosforilada 2,5% e carbodiimida 0,5 mol/L não influenciou na molhabilidade.
- A energia livre de superfície apresentou uma diminuição no substrato erodido, após a biomodificação com carbodiimida.
- A biomodificação com quitosana fosforilada 2,5% provocou mudanças significativas na morfologia superficial, provocando desmineralização e abertura dos túbulos dentinários.
- A biomodificação com quitosna fosforilada promoveu desmineralização superficial nos substratos hígido e erodido, com túbulos dentinários obliterados.
- A biomodificação com carbodiimida , promoveu efeito sutil nos componentes químicos da dentina, sem alterações marcantes na superfície.

Referências

REFERÊNCIAS

ADDY, M.; SHELLIS, R. P. Interaction between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 17-31, 2006.

ALONSO, J. R. L. et. al. Effect of crosslinkers on bond strength stability of fiber posts to root canal dentin and in situ proteolytic activity. **J Prosthet Dent**, v.119, n.3, p. 494.e1 - 494.e9, 2018.

AMAECHI, B. T.; HIGHAM, S. M.; EDGAR, W. M. Techniques for the production of dental eroded lesions in vitro. **J Oral Rehabil.**, v. 26, n. 2, p.97–102, 1999.

AMARAL, I. F.; GRANJA, P. L.; BARBOSA, M. A. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study. **J Biomater Sci Polym.**, v. 16, n. 12, p. 1575-93, 2005.

ATTIN, T.; WEGEHAUPT, F. J. Methods for assessment of dental erosion. **Monogr Oral Sci.**, v. 25, p. 123-142, 2014.

AYKUT-YETKINER, A.; ATTIN, T.; WIEGAND, A. Prevention of dentine erosion by brushing with anti-erosive toothpastes. **J Dent.**, v.42, n.7, p. 856-61, 2014.

BACHMANN, L. Changes in chemical composition and collagen structure of dentine tissue after erbium laser irradiation. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.**, v.61, n.11-12, p. 2634-9, 2005.

BARBOUR, M. E.; LUSSI, A., SHELLIS, R. P. Screening and prediction of erosive potential. **Caries Res.**, v.45, p. 24–32, 2011. Supplement 1.

BAX, D. V. et. al. Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds. **Acta Biomater.**, v. 49, p. 218–234, 2017.

BEDRAN-RUSSO, A. K. et. al. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. **Biomed Mater Res B appl Biomater.**, v.80, n.1, p. 268-72, 2007.

BEDRAN-RUSSO, A. K. et. al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dent Mater.**, v.30, n. 1, p. 62-76. 2014.

BEDRAN-RUSSO, A. K. et. al. Long-term Effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v.94, n.1, p. 250-5, 2010.

BELTRANE, A. P. C. A. et. al. Effect of Phosphorylated Chitosan on Dentin Erosion: An in vitro Study. **Caries Res.**, v.52, n.5, p. 378-386, 2018.

BOTTA, A. C. et. al. Effect of dental finishing instruments on the surface roughness of composite resins as elucidated by atomic force microscopy. **Microsc Microanal.**, v. 14, n.5, p.380-6, 2008.

CADENARO, M. et. al. Effect of carbodiimide on thermal denaturation temperature of dentin collagen. **Dent Mater.**, v.32, n.4, p. 492-8, 2016.

CHAUSSAIN-MILLER, C. et. al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. **J Dent Res.**, v. 85, n. 1, p. 22-32, 2006.

CHEN, Z. et. al. Whole-field macro- and micro-deformation characteristic of unbound water-loss in dentin hard tissue. **J Biophotonics.**, v. 11, n.9, p. e201700368, 2018.

COMBA, A. et. al. Carbodiimide inactivation of matrix metalloproteinases in radicular dentine. **J Dent.**, v.82, p. 56-62, 2019.

CHUNG, J. H. et. al. Synthesis, characterization, biocompatibility of hydroxyapatite-natural polymers nanocomposites for dentistry applications. **Artif Cells Nanomed Biotechnol.**, v.44, n.1, p. 277-84, 2016.

CRUZ, J. B. et. al. Bonding stability of adhesive systems to eroded dentin. **Braz Oral Res.**, v. 29, n.1, p. 1-6. 2015.

CURYLOFO-ZOTTI, F. A. et. al. Selective removal of carious lesion with Er:YAG laser followed by dentin biomodification with chitosan. **Lasers Med Sci.**, v.32, n.7, p. 1595-1603, 2017.

CURYLOFO-ZOTTI, F. A. et. al. Effect of Er: YAG laser irradiation and chitosan biomodification on the stability of resin/demineralized bovine dentin bond. **J Mech Behav Biomed Mater.**, v.91, p. 220-228, 2019.

DAOOD, U. et. al. Effect of chitosan/riboflavin modification on resin/dentin interface: Spectroscopic and microscopic investigations. **J Biomed Mater Res A.**, v.101, n.7, p. 1846–56, 2013.

DASH, J. et. al. Synthesis of bis-indolecarboximides as G-quadruplex stabilizing and inducing ligands. **Chemistry**, v.18, n.2, p. 554-64. 2012.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A. et. al. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. **Restor Dent Endod.**, v.40, n.3, p. 195-201, 2015.

EKAMBARAM, M.; YIU, C. K.; MATINLINNA, J. P. Effect of Solvents on Dentin Collagen Cross-Linking Potential of Carbodiimide. **J Adhes Dent.**, v.17, n.3, p. 219-26, 2015.

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.26, n.4, p. 288-294, 2012.

EL KNIDRI, H. et. al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **Int J Biol Macromol.**, v.120, pt. A, p.1181-1189, 2018.

- FAWZY, A. S. et. al. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. **J Mech Behav Biomed Mater.**, v.17, p. 278-289, 2013.
- FERNANDES, L. L. et. al. Cytocompatibility of Chitosan and Collagen-Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. **Polímeros**, v.21, n.1, p. 1-6, 2011.
- GANSS, C. et. al. Effect of Toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. **Eur J Oral Sci.**, v. 117, n.3, p. 225-260, 2009.
- GANSS, C. et. al. Effects of Two Fluoridation Measures on Erosion Progression in Human Enamel and Dentine in situ. **Caries Res.**, v.38, n.6, p.561-6, 2004.
- GU, L. S. Chitosan-Based Extrafibrillar Demineralization for Dentin Bonding. **J Dent Res.**, v.98, n.2, p. 186-193, 2019.
- GRIPPO, J. O. Biocorrosion vs. erosion: the 21st century and a time to change. **Compend Contin Educ Dent.**, v. 33, n.2, p. 33-37, 2012.
- IMAI, A. et. al. Influence of application method on surface free-energy and bond strength of universal adhesive systems to enamel. **Eur J Oral Sci.**, v.125, n.5, p. 385-395, 2017.
- JOÃO-SOUZA, S. H. et. al. Influence of desensitizing and anti-erosive toothpastes on dentine permeability: An in vitro study. **J Dent.**, v. Jul 24, p.103176, 2019. In press.
- JAYAKUMAR, R. et. al. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **Int J Biol Macromol.**, v.40, n.3, p. 175-81, 2007.
- JAYAKUMAR, R. et. al. Preparative methods of phosphorylated chitin and chitosan--an overview. **Int J Biol Macromol.**, v.43, n.3, p. 221-5, 2008.
- KISHEN, A. et. al. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. **Dent Mater.**, v.32, n.8, p. 968-77, 2016.
- KUMAR, R. M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **React Funct Polym.**, v.46, n.1, p.1-27, 2000.
- LUSSI, A. et. al. Methodology and models in erosion research. Foreword. **Caries Res.**, v.45, p.1, 2011. Supplement 1.
- LUSSI, A.; HELLWINGE, E. Risk assessment and preventive measures. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 220 - 229, 2014.
- MAZZONI, A. et. al. Cross-linking effect on dentin bond strength and MMPs activity. **Dent Mater.**, v.34, n.2, p. 288-295, 2017.
- MAZZONI, A. et. al. Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. **J Dent Res.**, v.93, n.3, p. 263-8, 2014.

MAZZONI, A. et. al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. **J Dent Res.**, v.91, n.5, p. 467-72, 2012.

MACHADO, A. C. Using fluoride mouthrinses before or after toothbrushing: effect on erosive tooth wear. **Arch Oral Biol.**, v.108, n. December, p.104520, 2019. In press.

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

MORI, T. et. al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. **Biomaterials.**, v.18, n.13, p. 947–951, 1997.

MOUSSA, D. G. et. al. Dentin Priming with Amphipathic Antimicrobial Peptides. **J Dent Res.**, v.98, n.10, p. 1112-21, 2019.

MUZZARELLI, R. A.; ROCHETTI, R. The determination of molybdenum in sea water by hot graphite atomic absorption spectrometry after concentration on p-aminobenzylcellulose or chitosan. **Anal Chim Acta.**, v.64, n.3, p.371-9, 1973.

OLDE-DAMINK, L. H. et. al. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. **J.Biomaterials**, v.17, n.8, p. 765-73, 1996.

PASHLEY, D. H. et. al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res.**, v. 83, n.3, p. 216-221, 2004.

PINI, N. I. et. al. In vitro Efficacy of Experimental Chitosan-Containing Solutions as Anti-Erosive Agents in Enamel. **Caries Res.**, v.50, n.3, p.337-45, 2016.

PROFETA, A. C. et. al. 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, n.4, p. 353–62, 2012.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **J Sci Ind Res.**, v.63, p.20-31, 2004.

SABATINI, C.; PASHLEY, D. H. Mechanisms regulating the degradation of dentine matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. **Am J Dent.**, v.27, n.4, p.203-14, 2014.

SANO, H. et. al. Effect of rinsing with phosphorylated chitosan on four-day plaque regrowth. **Bull Tokyo Dent Coll.**, v.42, n.4, p. 251-6, 2001.

SCHEFFEL, D. L. et. al. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. **Dent Mater.**, v.30, n.2, p.227-33, 2014a.

SCHEFFEL, D. L. et. al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. **Oper Dent.**,v.39, n.2, p. 152-8, 2014b.

SCHEFFEL, D. L. et. al. Increased Durability of Resin-Dentin Bonds Following Cross-Linking Treatment. **Oper Dent.**, v.40, n.5, p.533-9, 2015.

- SCHEFFEL, D. L.; YOUSEFIPOUR, B.; MOHAMMADI-BASSIR, M. Effect of Carbodiimide on Bonding Durability of Adhesive-cemented Fiber Posts in Root Canals. **Oper Dent.**, v.41, n.4, p.432-40, 2016.
- SCHLUETER, N. et. al. Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. **Acta Odontol Scand.**, v.68, n.3, p.180-4, 2010.
- SHANMUGAM, A.; KATHIRESAN, K., NAYAK, L. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan and phosphorylated chitosan from cuttlebone of *Sepia kobeensis* (Hoyle, 1885). **Biotechnol Rep (Amst)**., v.9, n.10, p. 25-30, 2016.
- SHRESTHA, A. et. al. Effect of hydration on the strain gradients in dental hard tissues after heat and cold application. **J Endod.**, v.36, n.10, p. 1643-7, 2010.
- SHRESTHA, A.; FRIEDMAN, S.; KISHEN, A. Photodynamically crosslinked and chitosan-incorporated dentin collagen. **J Dent Res.**, v.90, n.11, p. 1346-51, 2011.
- SILVA, P. V. et. al. Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. **Braz Dent J.**, v.23, n.4, p. 357-61, 2012.
- SIQUEIRA, F. S. F. et. al. Improving bonding to eroded dentin by using collagen cross-linking agents: 2 years of water storage. **Clin Oral Investig.**, p. 1-14, 2019. In press.
- SINGH, P. et. al. Effect of carbodiimide on the structural stability of resin/dentin interface. **J Conserv Dent.**, v.19, n.6, p. 501- 509, 2016.
- SONG, J. et. al. Nanogels of carboxymethyl chitosan and lysozyme encapsulated amorphous calcium phosphate to occlude dentinal tubules. **J Mater Sci Mater Med.**, v.29, n.6, p.84, 2018.
- TANGSADTHAKUN, C. et. al. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. **J Biomater Sci Polym Ed.**, v.18, n.2, p.147-63, 2007.
- TEN CATE, J. M.; DUIJSTERS, P. P. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res.**, v.16, n.3, p. 201-10, 1982.
- TJÄDERHANE, L. et. al. Optimizing dentin bond durability: strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer. **Dent Mater.**, v.29, n.10, p. 999-1011, 2013.
- INOUE, N. et. al. Surface free-energy measurements as indicators of the bonding characteristics of single-step self-etching adhesives. **Eur J Oral Sci.**, v.118, n.5, p.525-30, 2010.
- URURAHY, M. S. et. al. Wettability and surface morphology of eroded dentin treated with chitosan. **Arch Oral Biol.**, v.75, p.68-73, 2017.
- VANUSPONG, W.; EISENBURGER, M.; ADDY, M. Cervical tooth wear and sensitivity: erosion, softening and rehardening of dentine; effects of pH, time and ultrasonication. **J Clin Periodontol.**, v.29, n.4, p. 351-7, 2002.

WANG, K.; LIU, Q. Adsorption of phosphorylated chitosan on mineral surfaces. **Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.**, v. 436, p. 656-663, 2013.

WANG, K.; LIU, Q. Chemical structure analyses of phosphorylated chitosan. **Carbohydr Res.**, v.386, p. 48-56, 2014.

WANG, X. H. et. al. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. **Biomaterials.**, v.24, n.19, p. 3213-20, 2003.

WEST, N. X. et. al. Prevalence of dentine hypersensitivity and study of associated factors: a European population-based cross-sectional study. **J Dent.**, v.41, n.10, p. 841-51, 2013.

XU, Z. et. al. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v.98, n.1, p.150-9, 2011.

YAMAKAMI, S. A. et. al. Study of the chemical interaction between a high-viscosity glass ionomer cement and dentin. **JAppl Oral Sci.**, v.26, p. e20170384, 2018.

YOSHIDA, F. et. al. Influence of surface treatment of contaminated lithium disilicate and leuciteglassceramics on surface free energy and bond strength of universal adhesives. **Dent Mater J.**, v.34, n.6, p. 855-62, 2015.