



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto



Laura Andrade Cotrim

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE
DENTINÁRIA APÓS TRATAMENTO COM PRIMER
EXPERIMENTAL CONTENDO QUITOSANA
NANOPARTICULADA**



Ribeirão Preto

2020

Laura Andrade Cotrim

Versão corrigida

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DENTINÁRIA APÓS
TRATAMENTO COM PRIMER EXPERIMENTAL CONTENDO QUITOSANA
NANOPARTICULADA**

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

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dra. Maria Cristina Borsato

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cotrim, Laura Andrade

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DENTINÁRIA APÓS TRATAMENTO COM PRIMER EXPERIMENTAL CONTENDO QUITOSANA NANOPARTICULADA, 2020. Versão corrigida
75p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Borsato, Maria Cristina

1. Dentina; 2. Interação Química; 3. FTIR 4. Superfície dentinária; 5. quitosana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cotrim, LAC. Avaliação da Interação Química da superfície dentinária após tratamento com primer experimental contendo quitosana nanoparticulada. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo -2021.

Aprovado em: __/ __/ 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Orientador Prof. Dra. Maria Cristina Borsato

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto- USP

Assinatura: _____

Dedico este trabalho,

À Deus,

Por guiar meus passos me dar sabedoria e proteção necessária para esta caminhada.

Ao meu marido,

Lucas agradeço por tudo que me incentiva a conquistar sozinha. Se não estivesse ao meu lado, nada teria o mesmo sentido. Sempre me ouviu, aconselhou, sonhou, realizou isto tudo comigo e ainda suportou muitas vezes, a minha ausência. Obrigada pela paciência, parceria e amor.

Aos meus Pais, Marcus e Joana, pelo amor, educação que me deram, por todo incentivo aos estudos e ao meu crescimento profissional. São fortalezas que me asseguram. Obrigada por me ensinarem a caminhar e, assim, poder seguir meus próprios passos. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, tanto nas alegrias como nos momentos difíceis e me fazerem querer ser sempre uma pessoa melhor.

À Minha Querida Família,

A minha irmã, meu cunhado Bruno e afilhado José Marcus vocês que me deram um lar em Ribeirão. A saudade de casa ficou menor com vocês perto de mim. A minha irmã Paula, cunhado Rick e Manu, meu suporte em Barretos. Obrigada por ser rede de apoio em todos os momentos da minha vida,

Aos Meus Amigos do Curso de Pós-Graduação da FORP/USP, Mestrado e Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, em especial à **Helôisa Aparecida Orsini, Lana Kei, Lisa Cursino, Thais Tedesqui,** com os quais tive o prazer em compartilhar momentos de aflições e alegrias. A amizade e companhia de vocês foram essenciais.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Minha querida Orientadora Profa. Dra. Maria Cristina Borsato,

Querida Professora, minha eterna admiração e respeito! Tanto no aspecto profissional quanto pessoal. Além de ótima profissional/professora/pesquisadora, me inspirou a querer ser não só uma profissional melhor, mas também uma pessoa melhor. Além disso, Cris, sempre foi muito solícita, amável, bem-humorada e otimista. Tê-la como orientadora, foi um presente divino!

Faltam palavras para agradecer por toda a paciência e ensinamentos! Gratidão!

À Querida amiga e Cirurgiã-Dentista Carolina Torres Mantovani,

Por seus ensinamentos, conselhos e todo apoio que me deu! Também por ser uma profissional incrível, amiga e pessoa que me faz entender o quão a odontologia clínica é apaixonante! Eterna admiração por você Cá.

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo, nas pessoas do atual Reitor Prof. Dr. Vahan Agopyan, e do Vice-Diretor Prof. Dr. Antônio Carlos Hernandez.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Diretora, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, e do Vice-Diretor Prof. Ricardo Gariba Silva.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato, e da Vice-Coordenadora, Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva.

A professora Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari, do Laboratório de Nanobiotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/Brasil, fundamental para a execução desse trabalho. Ao querido professor Luciano Bachmann do departamento Departamento de Física FFCLRP, meu sincero agradecimento à sua sabedoria à sua infinita paciência e disponibilidade

A professora Dra. Regina Regina Guenka Palma-Dibb, do Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, que viabilizou o estudo ser realizado no laboratório de Microscopia Confocal a Laser, muito solícita, paciente e amável, também a Dra. Juliana Faraoni na qual me auxiliou com a parte laboratorial. Muito obrigada.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil da FORP-USP, prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Prof. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, Prof. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Prof. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Prof. Dra. Andiará De Rossi Daldegan, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Prof. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Prof. Dra. Maria Cristina Borsato, Prof. Dr. Francisco

Wanderley Garcia de Paula e Silva, Prof. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, Prof. Dr. Murilo Feres e Prof. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, por todos os ensinamentos.

Aos Funcionários do Departamento de Clínica Infantil,

Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zanella, Mary Carmessano, Nilza Leticia Magalhães, Marco Antônio dos Santos, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Fátima Aparecida Rizoli e Rosemary Alves, por todo o apoio oferecido no dia-a-dia e por sempre me tratarem com tanto carinho e paciência.

Aos Funcionários da FORP/USP,

José Aparecido Neves do nascimento, Vera do Nascimento Scandelai, Karina Dadalt Quaglio, Gledson Antunes da Silva, Kleber Augusto Loureiro, Adriana de Mattos Gonçalves da Silva e Hermano Teixeira Machado, por todo o carinho e suporte. Muito Obrigada.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

Cotrim, LAC. Avaliação da Interação Química da superfície dentinária após tratamento com primer experimental contendo quitosana nanoparticulada.[dissertação].Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - 2020.

Pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de descobrir novos compostos que consigam inibir a degradação da matriz de colágeno dentinária, dentre elas a quitosana. Poucos trabalhos com a quitosana nanoparticulada comprovam sua ação nas estruturas dentinárias. Portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição química dentinária após utilização de um primer experimental com nanopartículas de quitosana incorporados a sua composição, por meio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e análise morfológica da superfície dentinária por meio de Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Foram seccionados dentes obtidos do Biobanco de dentes humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) – USP obtendo 6 espécimes para a análise de FTIR, no qual foram avaliados em três momentos distintos, antes do condicionamento ácido da superfície, após condicionamento ácido utilizando ácido fosfórico a 37% e após aplicação das substâncias analisadas, primer experimental de quitosana nanoparticulada e clorexidina. Para a análise de Microscopia Confocal a Laser, foram utilizados 24 espécimes, divididos em quatro grupos, Grupo 1 - sem tratamento da superfície dentinária; Grupo 2 - após condicionamento com ácido fosfórico a 37%, Grupo 3 - após aplicação de clorexidina e, Grupo 4 - após a aplicação do primer experimental de quitosana. Os resultados da análise de FTIR foram dados qualitativos enquanto da microscopia confocal a laser a análise estatística utilizada foi à análise de variância (ANOVA) com um fator: contagem versus grupo, seguido de comparações emparelhadas de Tukey, informações de agrupamento usando método de Tukey. Pode-se observar diferença estatisticamente significativa na contagem de túbulos dentinários apenas no Grupo 2 (condicionamento com ácido fosfórico a 37%), em comparação aos demais grupos (G1, G3 e G4) ($p=0,0001$). Conclui-se que o primer de quitosana nanoparticulada interfere de maneira benéfica e sutil na superfície dentinária, demonstrou ser mais bem depositada nos túbulos dentinários com relação à clorexidina, porém sem significância estatística.

Palavras - Chave: Dentina, superfície dentinária, quitosana, FTIR.

ABSTRACT

Cotrim, LAC. Evaluation of the Chemical Interaction of the dentin surface after treatment with an experimental primer containing nanoparticulate chitosan. [Dissertation]. Ribeirão Preto School of Dentistry - University of São Paulo - 2020.

Research is being carried out in order to discover new compounds that can inhibit the degradation of the dentin collagen matrix, including chitosan. Few studies with nanoparticulate chitosan prove its action on dentinal structures. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the dentin chemical composition after using an experimental primer with chitosan nanoparticles incorporated into its composition, using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and morphological analysis of the dentin surface using Microscopy Laser Scanning Confocal. Teeth obtained from the Human Teeth Biobank of the Ribeirão Preto School of Dentistry (FORP) - USP were sectioned, obtaining 6 specimens for the FTIR analysis, in which they were evaluated at three different moments, before the acid etching of the surface, after etching using 37% phosphoric acid and after application of the analyzed substances, an experimental nanoparticulate chitosan primer and chlorhexidine. For the analysis of Confocal Laser Microscopy, 24 specimens were used, divided into four groups, Group 1 - without dentin surface treatment; Group 2 - after conditioning with 37% phosphoric acid, Group 3 - after application of chlorhexidine and, Group 4 - after application of the experimental chitosan primer. The results of the FTIR analysis were qualitative data while from confocal laser microscopy the statistical analysis used was the analysis of variance (ANOVA) with a factor: count versus group, followed by Tukey's paired comparisons, clustering information using Tukey's method. A statistically significant difference can be observed in the dentinal tubule count only in Group 2 (conditioning with 37% phosphoric acid), compared to the other groups (G1, G3 and G4) ($p = 0.0001$). It is concluded that the nanoparticulate chitosan primer interferes in a beneficial and subtle way on the dentinal surface, it has been shown to be better deposited in the dentinal tubules in relation to chlorhexidine, but without statistical significance.

Keywords: Dentin, dentin surface, chitosan, FTIR

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo geral.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Aspectos Éticos	16
3.2 Delineamento Experimental	16
3.3 Preparo dos corpos de prova	16
3.4 Preparo e caracterização das nanopartículas	17
3.5 Preparação do Primer experimental contendo Nanopartículas de Quitosana.....	17
3.6 Caracterização das NLS de Quitosana	18
3.7 Análise da composição química dentinária - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	18
3.8 Análise morfológica da superfície dentinária - Microscopia Confocal de Varredura a Laser	20
3.9 Análise dos dados.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Resultados da Análise por FTIR	23
4.2 Microscopia Confocal a Laser.....	27
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Os materiais odontológicos estão em constante desenvolvimento, como os compósitos resinosos e sistemas adesivos, que alcançaram melhorias em suas propriedades físico-químicas e mecânicas com o objetivo de obter uma longevidade das restaurações adesivas, por meio de um selamento marginal durável e efetivo. Nesse sentido, estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar melhores mecanismos de união aos substratos, desenvolvendo técnicas e biomateriais eficazes para restaurar de forma duradoura a estrutura dentária perdida (Krifka, 2013; Benetti, 2013).

O principal fator de insucesso de uma restauração utilizando compósitos resinosos é a microinfiltração na interface esmalte/restauração, que por sua vez tem sido praticamente eliminada desde a introdução de condicionamento ácido. No entanto, a longevidade da camada híbrida permanece um desafio, visto que, a dentina apresenta características que dificultam a obtenção de uma união efetiva, que poderá ocasionar uma degradação bioquímica (Barkmeier & Cooley, 1992; Gonçalves et al., 1996; Araújo & Botino, 1998; Cardoso & Vieira, 1998; Zheng, & Chen, 2017).

Dentre alguns fatores causadores dessa degradação é importante ressaltar o alto conteúdo orgânico dentinário, presença de fluido canalicular, permeabilidade, *smear layer*, e a diferença de coeficiente de expansão térmica entre a estrutura dental e o material restaurador, aumentando a possibilidade de deterioração da camada híbrida. Nesse contexto, a degradação ocorrida em nível de estrutura dentinária, pode atingir a própria composição da dentina, com a hidrólise das fibras colágenas causada principalmente pela ação das metaloproteínases (MMPs). (Marshall et al., 1997; Oda, Zárate-Pereira et al., 2001; García-Godoy et al., 2007; Opdam et al., 2014).

As MMPs são proteases dependentes de zinco (Zn) e cálcio (Ca), que são capazes de degradar o colágeno que constitui a matriz dentinária, tanto na sua forma natural quanto desmineralizada. As proteases comumente encontradas nos tecidos dentários são MMP 2 e 9 gelatinase, MMP 8 colagenase e a MMP 20 que possuem capacidade de degradação da dentina. Estas apresentam propriedades destrutivas e podem ser ativadas através da solubilização da matriz dentinária, por

um processo de cárie ou por remoção de matérias inorgânicas do substrato (Sulkala et al., 2002; De Munk et al., 2003; Pashley et al., 2004; Mazzoni et al., 2006 ; Sulkala et al., 2007; Carrilho et al., 2009; Boushell et al., 2011; Kato et al., 2011; Tjärderhane, 2015; Tekçe et al., 2016).

A manutenção da integridade das estruturas, como a matriz dentinária, faz com que a longevidade da interface adesiva seja aumentada, sendo um fator importante para o sucesso das restaurações. Com isso, a inibição das metaloproteinases torna-se benéfica e necessária para manter a estabilidade da adesão entre materiais adesivos e a dentina (Marshall et al., 1997), uma vez que estas enzimas hidrolisam o colágeno não protegido pelo sistema adesivo no interior da camada híbrida levando à redução da resistência de união nesta interface (De Munik et al., 2003).

Algumas substâncias naturais e sintéticas têm sido utilizadas com o intuito de prevenir a degradação da camada híbrida, aumentar o número de ligações peptídicas intra e intermolecular e microfibrilar de colágeno, como a Clorexidina (CHX). Estudos demonstram que a incorporação dessa substância a sistemas adesivos obtiveram resultados satisfatórios, atuando como potente inibidor de MMP devido ao fato de coibir a gelatinase/colagenase por meio de quelação não específica de Zn e Ca, íons que são necessários para manter as funções enzimáticas das MMPs (Gendron et al., 1999; Hebling et al., 2005; ; Carrilho et al., 2007b; Breschi et al., 2009; Loguercio et al., 2009; Tjärderhane et al., 2013; Tjärderhane et al., 2015).

Inúmeras pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de descobrir novos compostos que consigam inibir a degradação da matriz de colágeno dentinária, dentre elas a quitosana (Breschi et al., 2010; Zheng et al., 2015). A quitosana é um biopolímero policatiônico obtido por meio de desacetilação alcalina da quitina, sendo este um biomaterial amplamente estudado e têm sido utilizado em várias áreas da saúde, aplicado à Odontologia em diferentes materiais, como em formulações de cimentos dentários e colutórios, devido a suas propriedades antibacterianas e quelantes (Rinaudo, 2006; Tavarina et al., 2013, Zhang et al., 2018). Além disso, seu alto teor de nitrogênio tem demonstrado ser veículo potencial para transportar íons como cálcio e fosfato para biomineralização, sendo úteis na modulação do

comportamento mineral de hidroxiapatita durante a engenharia de tecidos dentários in situ (Tian et al., 2012; Zhang et al., 2018).

Muitos trabalhos foram realizados com esse biopolímero na forma microparticulada, em diferentes formulações e aplicações. Outra forma investigada é a quitosana nanoparticulada (CSnp,) sugerindo a possibilidade de inibição da aderência bacteriana à dentina, que, por sua vez, impediria recolonização bacteriana e formação de biofilme, relacionando este efeito diretamente com a interação das nanopartículas com bactéria-substrato (Kishen et al.,2008). Outras pesquisas também com CSnp, demonstraram que o colágeno tipo I no modelo de fibrila única e colágeno da matriz de dentina, após a reticulação com CSnp, proporcionou uma estabilidade na degradação mediada por colagenase bacteriana, sugerindo que essa substância bloqueia a colagenase em locais de ligação no colágeno inibindo sua atividade enzimática, aumentando assim a resistência à degradação do colágeno tipo I. (Kishen et al.; 2016).

A nanotecnologia, atualmente, auxilia a Odontologia no desenvolvimento de diversos materiais, a partir da habilidade de manipulação de átomos em uma escala compreendida entre 0,1 e 100 nm, exibindo propriedades e fenômenos físicos, químicos e biológicos, significativamente novos e modificados devido à sua escala nanométrica. Os desafios existentes para desenvolver essa tecnologia consistem em dominar as propriedades e os riscos desses nanomateriais, entretanto é de grande valia os esforços em desenvolvê-los, pois estes permitirão o avanço de produtos com qualidade superior e, possivelmente, mais eficientes (Durán et al., 2006; Assis, et al., 2012).

Diante do exposto, embora existam estudos na literatura que destacam o uso do biopolímero na Odontologia, poucos trabalhos com a quitosana nanoparticulada comprovam sua ação nas estruturas dentinárias. Vale ressaltar ainda que, como a Odontologia caminha em busca de biomateriais, principalmente aqueles que promovam uma longevidade das restaurações. Assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas para avaliação química de possíveis interações decorrentes da utilização de CSnp incorporada a um primer experimental em dentina.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a composição química dentinária após utilização de um primer experimental com nanopartículas de Quitosana incorporados a sua composição, por meio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e análise morfológica da superfície dentinária por meio de Microscopia Confocal de Varredura a Laser.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

A etapa laboratorial deste trabalho foi iniciada após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CAAE: processo n° 3.897.526).

3.2 Delineamento Experimental

O fator em estudo envolvido neste trabalho é a interação da superfície, tipo de tratamento da superfície dentinária utilizando primer experimental contendo quitosana nanoparticulada em comparação com a solução de clorexidina 2% (CLX). As variáveis de resposta qualitativas e quantitativas são as análises de composição química do substrato dentinário por meio da avaliação do espectro de absorção da amostra através de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), e análise da superfície dentinária utilizando a Microscopia Confocal de Varredura a Laser.

3.3 Preparo dos corpos de prova

A amostra foi composta de 25 molares humanos hígidos coletados junto ao Biobanco de dentes humanos da FORP – USP. Os dentes foram limpos com pedra pomes e água com auxílio de uma escova de Robinson (Microdon - Industria e Comércio, Socorro/SP), montado em contra-ângulo em baixa rotação. Posteriormente, foram armazenados em água destilada à temperatura de -2° C até o início do experimento. Inicialmente, as porções radiculares e terço oclusal foram seccionados, utilizando disco diamantado (Struers, A/S, Dinamarca) sob refrigeração em cortadeira metalográfica (Minitom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark). Em seguida, os dentes foram fixados em cera e cortados transversalmente para obtenção de espécimes de dentina com tamanhos de 3 x 3 mm x 2mm. Logo após, as superfícies dentinárias foram avaliadas em lupa estereoscópica (Carls Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com o aumento de 40 x para assegurar que o esmalte tinha sido totalmente removido. Os fragmentos foram

polidos por meio de uma Politriz (Aropol 2V, Arotec Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil) utilizando lixas d'água de granulação 1200 e 4000. Finalizando essa etapa os dentes permaneceram em água deionizada a 4° C

No total dos 25 molares, foram preparados 30 espécimes para pesquisa, sendo utilizados, 6 espécimes (n=6) para a análise de FTIR, e 24 espécimes (n=24) para a análise de Microscopia Confocal de Varredura a Laser.

3.4 Preparo e caracterização das nanopartículas

O processo de preparo e caracterização das nanopartículas, bem como as análises físico-químicas foi realizado no Laboratório de Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), com a colaboração da Prof^a. Dra. Priscyla Daniely Marcato.

3.5 Preparação do Primer experimental contendo Nanopartículas de Quitosana

A formulação do primer experimental contendo nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de quitosana foi realizada pelo método de confecção de uma emulsão seguida de um processo de sonicação, dividida em duas fases. Na primeira fase do processo, foi preparada uma solução contendo quitosana de baixo peso molecular (CAS 9012764 Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) e água deionizada. Assim, 10 ml dessa solução foram diluídas em 10 ml de água deionizada e acrescentando 0.5% de pluronic F68 (Sigma Aldrich, Germany).

A segunda fase do processo representa a fase oleosa, utilizando manteiga de illipê (MI) ou lipídio de ésteres cetílicos (Crodamol SS). Este processo se deu por meio do aquecimento das duas fases a 60°C separadamente. Após atingir essa temperatura, a solução aquosa foi adicionada a fase oleosa a 1%, sendo esta emulsão sonicada por 10 minutos em uma temperatura de 48°C e amplitude de 40% (Sonics VCx750, USA). As NLS de quitosana foram formadas após o resfriamento de dispersão até 25°C.

3.6 Caracterização das NLS de Quitosana

As aferições do diâmetro médio das partículas, índice de dispersão (PDI) e Potencial Zeta das NLS foram realizadas por meio de espelhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando Zetasizer Nano ZS90 (Malven, UK). As NLS foram diluídas em cloreto de potássio (1:100) e aferidas em triplicata (Piveta T et al., 2018).

3.7 Análise da composição química dentinária - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia de absorção estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria utilizando a região do infravermelho do espectro eletromagnético, esta é utilizada para caracterização química dos substratos dentais (Taube et al., 2010). Para este estudo, serão utilizados 3 espécimes para cada grupo: Clorexidina e primer experimental de quitosana nanoparticulada.

Na análise de FTIR cada espécime foi analisado em momentos distintos (figura 1), antes do condicionamento ácido da superfície, após condicionamento ácido utilizando ácido fosfórico a 37% (Condac – FGM; Dentscare LTDA, Joinville-Brasil) durante 15 segundos, no qual foram lavados com água deionizada durante 15 segundos e secos com ar comprimido, e após aplicação das substâncias analisadas, clorexidina e primer experimental, aplicados suavemente com o auxílio de um microaplicador (KG SORENSEN Cotia – SP).

Os espécimes foram posicionados em uma janela de diamante, um acessório de ATR (Attenuated Total Reflectance) com diâmetro de 2mm (DuraScope TM: Smiths Detection, Danbury-CT, EUA). O acessório é acoplado ao Espectrômetro no Infravermelho por Transformada de Fourier (Nicolet-380 FT-IR Spectrometer: Nicolet, Vernon Hills-II, EUA), (figura 2). A medida experimental constitui-se na aquisição do espectro de absorbância na região entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ com resolução $0,5 \text{ cm}^{-1}$ e 32 varreduras para aquisição de cada espectro. Esta instrumentação foi realizada sob supervisão do Prof. Luciano Bachmann do Departamento de Física e Matemática da Faculdade de Filosofia, ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP).

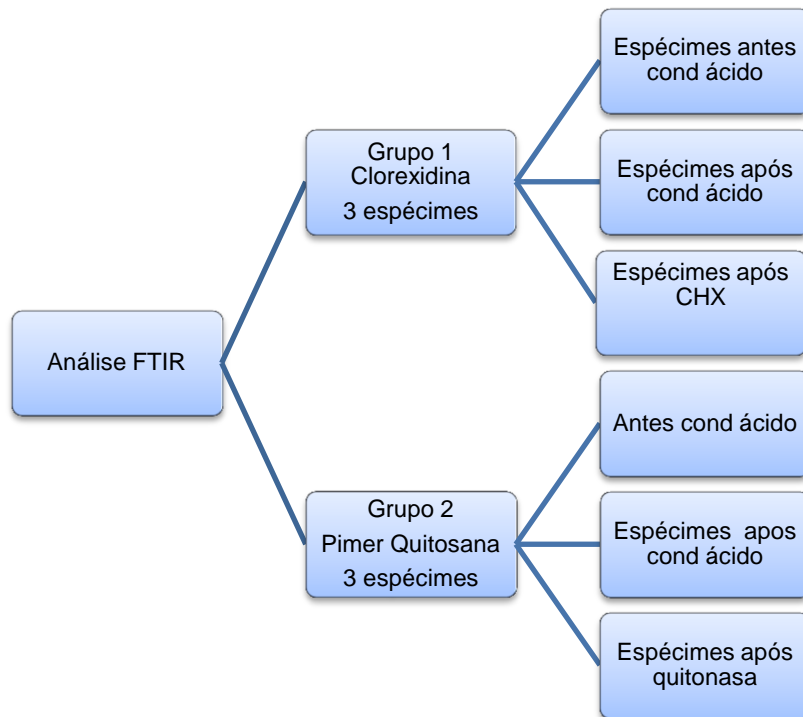


Figura 1- Organograma representativo da sequência experimental da análise por FTIR

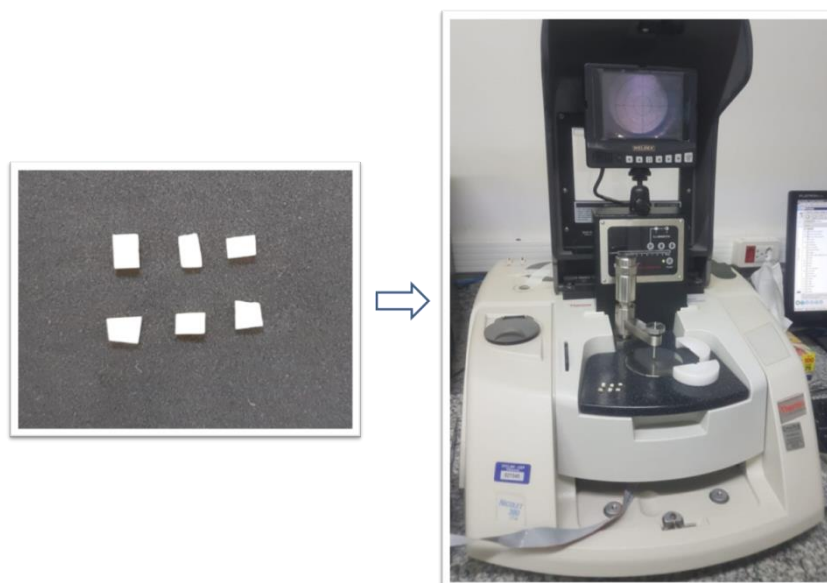


Figura 2- Imagens demonstrando os espécimes durante a análise de FTIR

3.8 Análise morfológica da superfície dentinária - Microscopia Confocal de Varredura a Laser

A microscopia confocal é caracterizada pela sua capacidade de produzir imagens tridimensionais a partir de amostras de vários tamanhos, incluindo as espessas, além disso, nas amostras espessas é possível obter imagens de seus planos específicos sem a necessidade de submeter à amostra a processamentos físicos como o seu seccionamento em micrótomos o que poderia gerar artefatos na imagem tridimensional final.

As bases físicas dos microscópios confocais de varredura são as mesmas para os microscópios de luz convencionais as quais foram adicionadas as modificações necessárias para que os princípios da confocalidade sejam aplicados, sendo assim, a imagem adquirida no microscópio confocal é muito diferente da forma pela qual a imagem é adquirida em um microscópio convencional, a fonte luminosa utilizada para a microscopia confocal é o laser. O feixe de luz coerente percorre um caminho óptico alinhado com o eixo óptico da objetiva preenchendo toda a parte traseira da lente com luz. Desta forma, a objetiva focaliza um volume limitado da amostra dado pela difração da luz dentro da amostra gerando a iluminação pontual desejada. O sinal elétrico no fotomultiplicador é digitalizado e processado pela estação de trabalho (computador) através do programa que controla o equipamento.

Para esta análise foram utilizados 24 espécimes divididos em quatro grupos (n=6). Grupo 1 - sem tratamento da superfície dentinária; Grupo 2 - após condicionamento ácido utilizando ácido fosfórico a 37% (Condac – FGM; Dentscare LTDA, Joinvile-Brasil) durante 15 segundos, no qual foram lavados com água deionizada durante 15 segundos e secos com comprimido Grupo 3 - após aplicação de clorexidina e, Grupo 4 - após a aplicação do primer experimental, aplicados suavemente com o auxílio de um microaplicador durante 15 segundos (figura 3).

Para captura inicial das imagens, os espécimes foram posicionados paralelamente à mesa do microscópio Confocal a laser (LEXT OLS4000®, Olympus, Tokyo, Japão), (figura 4) empregando um software específico (OLS4000, Olympus, Japão), sendo obtidas imagens da área na região central de cada espécime, para análise,

utilizando objetiva de 50X, obtendo imagens com 214x de aumento. As imagens foram salvas em formato TIFF.

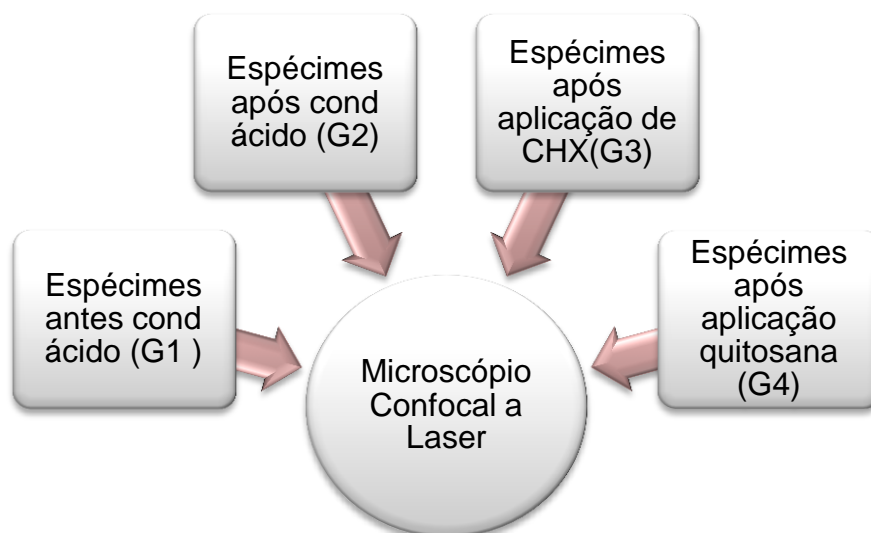


Figura 3- Organograma representativo da sequência experimental da análise de microscopia confocal a laser



Figura 4- Microscópio Confocal a Laser

As análises na microscopia confocal foram realizadas comparando o número, área e perímetro do lúmen dos túbulos dentinários da porção oclusal (Figura 5). As imagens obtidas dos espécimes foram padronizadas na mesma região antes e depois das soluções empregadas. Por meio do software OLS 4000, foram localizados os túbulos em cada imagem e realizado o cálculo do número de túbulos, área (μm^2), perímetro (μm) e diâmetro (μm).

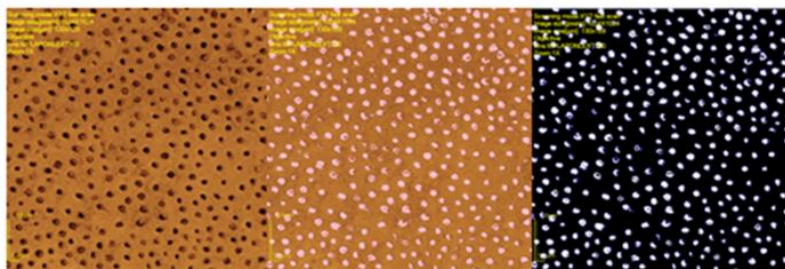


Figura 5- Mensuração do número, área, diâmetro e perímetro dos túbulos dentinários

3.9 Análise dos dados

Para análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com um fator: contagem versus grupo, seguido de comparações emparelhadas de Tukey, informações de agrupamento usando método de Tukey com intervalo de confiança de 95% e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para estatísticas descritivas dos dados referentes às variáveis em estudo. O cálculo consistiu na média e desvio padrão e, ainda, na representação gráfica das mesmas, com o gráfico de colunas e, quando foi o caso, de dispersão.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados da Análise por FTIR

De acordo com a figura 6, observam-se bandas de sua matriz mineral, constituída em 69% por hidroxiapatita carbonatada. Na análise dos dados do grupo Clorexidina, pode-se observar que houve um padrão regular nas bandas dos espectros entre as três amostras neste grupo. Os valores dos espectros da superfície dentinária não tratada, pode ser demonstrado com os picos dos principais componentes da dentina. Nas bandas entre 1100 a 980 cm^{-1} denota a quantidade do radical de fosfato (PO_4^{3-}). Nos picos de 870 cm^{-1} a 850 cm^{-1} , quantifica-se o carbonato (CO_3^{2-}) presentes na matriz inorgânica. Na sequência as amostras foram analisadas após condicionamento com ácido fosfórico e pode-se observar alteração na leitura dos espectros no qual há diminuição relativa de matéria inorgânica nas três amostras analisadas, representando diminuição na quantidade de fosfato e carbonato. Na sequência verificou-se que após aplicação da Clorexidina 2%, os espectros demonstraram que houve alteração na composição química dentinária entre os diferentes momentos de captura dos espectros, mas estas alterações não se apresentaram com grande intensidade de forma que a clorexidina não alterou a estrutura das bandas observadas após o tratamento ácido.

Na figura 7 observam-se as bandas da matriz orgânica do tecido constituída de 20% de substância (colágeno). Estas bandas podem ser associadas à amida III da matriz orgânica e pode ser observado o efeito dos tratamentos sobre esta matriz. Na análise dos dados do grupo Clorexidina, pode-se observar que houve um padrão regular nas bandas dos espectros entre as três amostras neste grupo. Os valores dos espectros da superfície dentinária não tratada, pode ser demonstrado com os picos dos componentes orgânicos da dentina. Nas bandas entre 1220 a 1180 cm^{-1} denota a quantidade de Carbonato e amida tipo II, nos picos entre 1290 a 1270 cm^{-1} quantifica-se o grupo amida III e estrutura de colágeno.

Nos resultados das amostras obtidas após condicionamento ácido verifica-se aumento da exposição do conteúdo orgânico como observados nas bandas posicionadas em 1350 a 1330 e 1250 a 1210 cm^{-1} . Este aumento sugere a remoção da *smear layer*, (composto de pequenas partículas de matriz colágena mineralizada), bem como partículas dentinárias inorgânicas e microrganismos. Após a aplicação da CLX 2%, observamos nas amostras um aumento das bandas de

1050 a 900 cm^{-1} (figura 6) e os picos espectrais ficam entre os valores médios das bandas de dentina, sem tratamento e após condicionamento ácido.

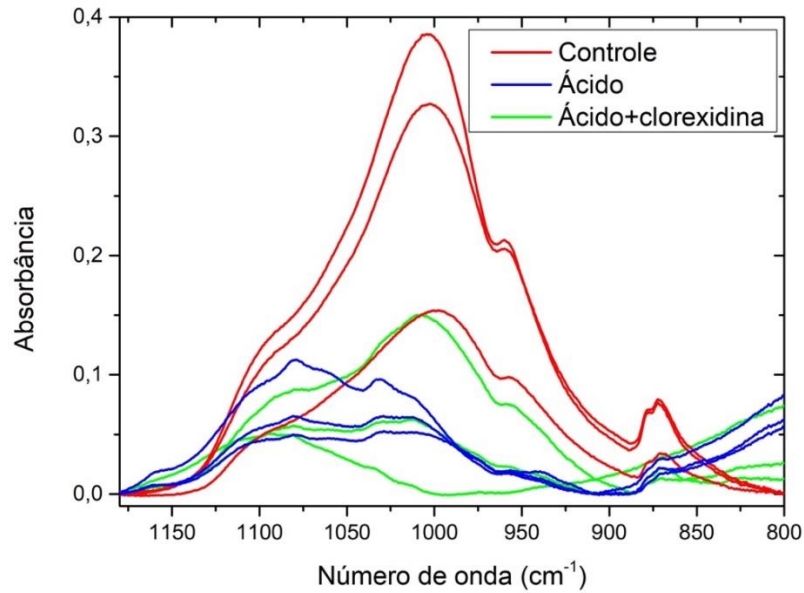


Figura 6 – Espectro de absorção dos compostos analisados na região espectral entre 1150 - 800 cm^{-1} destacando as principais bandas associadas à matriz mineral da dentina para o tecido sem tratamento, após o ácido e clorexidina.

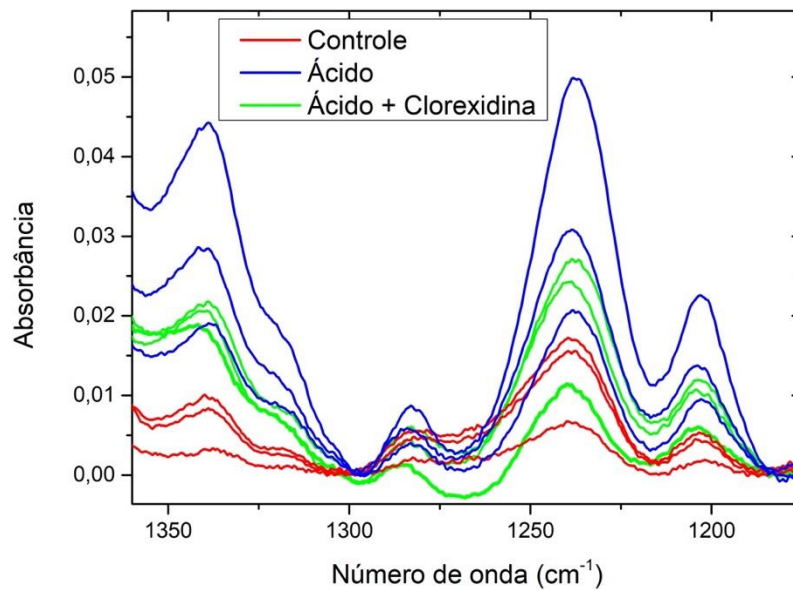


Figura 7- Espectro de absorção da dentina não tratada, após o condicionamento com ácido e após o tratamento com clorexidina entre 1350 - 1150 cm^{-1} evidenciando as bandas da matriz orgânica do tecido.

No grupo 2, primer experimental de quitosana nanoparticulada (figura 8) os resultados assemelham-se ao grupo anterior, que demonstra pouca diferença entre as leituras dos espectros antes do tratamento da superfície dentinária, na qual observa-se a quantidade de fosfato, correspondente aos valores das bandas entre 1030 a 980 cm^{-1} . Na sequência, pode-se observar a quantidade de carbonato nas bandas 880 a 850 cm^{-1} , presentes na matriz inorgânica dentinária. Após o condicionamento ácido verifica-se a diminuição na banda do fosfato representado pelo pico espectral entre 1130 a 1040 cm^{-1} e praticamente nenhuma quantidade de carbonato é observada. Quando aplicado o primer experimental é possível notar uma leve reposição de minerais na superfície dentinária, verificados no valor da banda entre 1120 a 1030 cm^{-1} aproximadamente. O que pode ser justificado pelo fato de que a quitosana torna-se solúvel em água e ácidos inorgânicos e orgânicos como ácido acético, láctico, clorídrico, tornando-se protonados e carregando a molécula positivamente (figura 7).

Na figura 9, observam-se as bandas da matriz orgânica após o tratamento com a quitosana. Em comparação com a figura 7 nota-se a leitura dos espectros semelhantes, demonstrando a quantidade de material orgânico presente na dentina nos picos espectrais entre 1350 a 1330 cm^{-1} representando a amida tipo II, nas bandas entre 1290 a 1270 cm^{-1} . Após condicionamento ácido, na sequência, há aumento das bandas representadas nos espectros 1350 a 1330 cm^{-1} , 1290 a 1270 e 1250 a 1210 cm^{-1} e 1210 a 1190 cm^{-1} e pode caracterizar deste modo, que após o condicionamento ácido, consequentemente a matéria orgânica presente em dentina é ressaltada.

Após aplicação do primer experimental de nanopartículas de quitosana, semelhante ao grupo da Clorexidina, observa-se aumento do espectro na região de 1140 a 1040 cm^{-1} (figura 8) e assim, é possível correlacionar com as características e propriedades da quitosana, biopolímero natural, que apresenta capacidade de formar substâncias inorgânicas, no qual demonstram a possibilidade de ligações de hidrogênio entre quitosana e hidroxiapatita, e ligações iônicas.

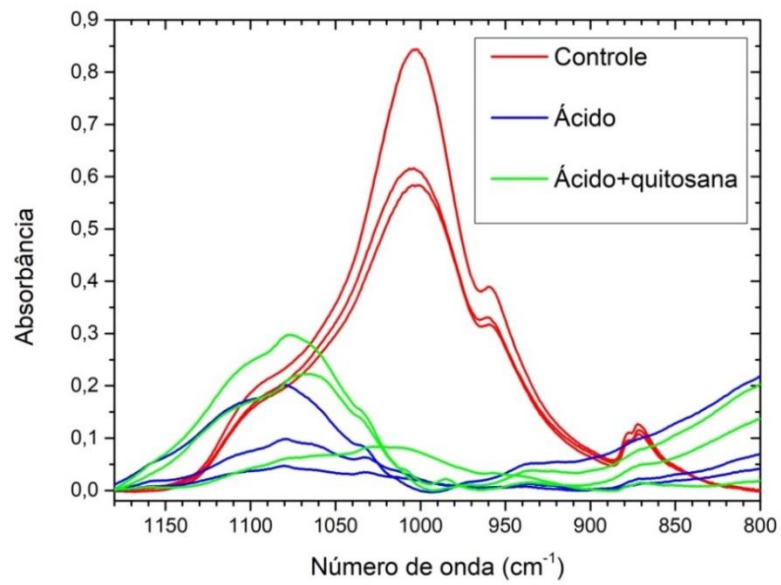


Figura 8- Espectro de absorção dos compostos analisados na região espectral entre 1150-800 cm-1 destacando as principais bandas associadas à matriz mineral da dentina para o tecido sem tratamento, após o ácido e primer experimental de quitosana.

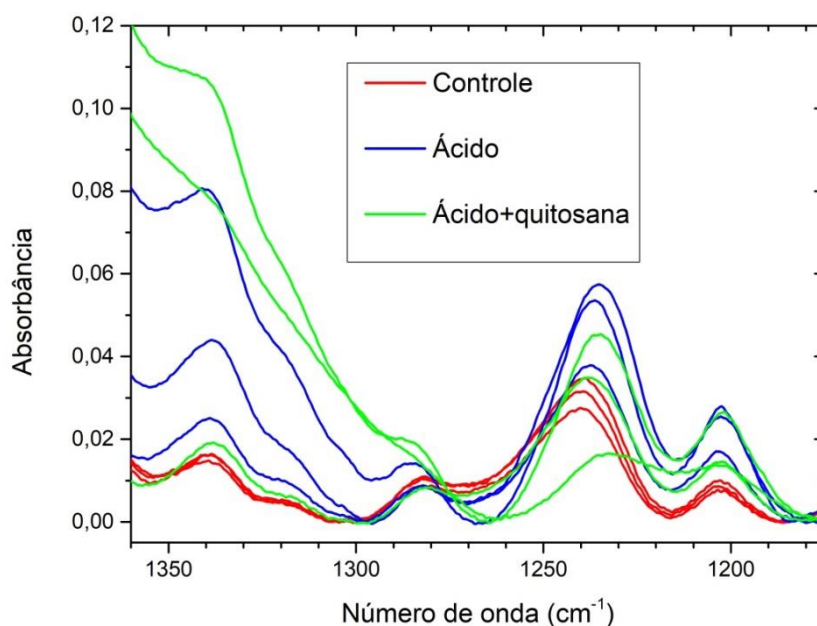


Figura 9- Espectro de absorção da dentina não tratada, após o condicionamento com ácido e após o condicionamento com primer experimental de quitosana entre 1350-1150 cm^{-1} evidenciando as bandas da matriz orgânica do tecido.

4.2 Microscopia Confocal a Laser

Os espécimes dos Grupos G1, G2, G3 E G4, foram analisados em Microscopia Confocal a Laser 3D em três momentos distintos: antes do condicionamento ácido da superfície dentinária, após o condicionamento ácido e após o tratamento das superfícies com a clorexidina e com o primer experimental de quitosana nanoparticulada.

Na figura 10 é possível observar os túbulos dentinários antes (figura 10A) e após o condicionamento ácido (figura 10B) Nota-se que após a aplicação a superfície da dentina apresentou a desmineralização da dentina peritubular, embocadura dos túbulos dentinários expostos e ampliados, e a porção intertubular bem organizado, sem presença de *smear layer*

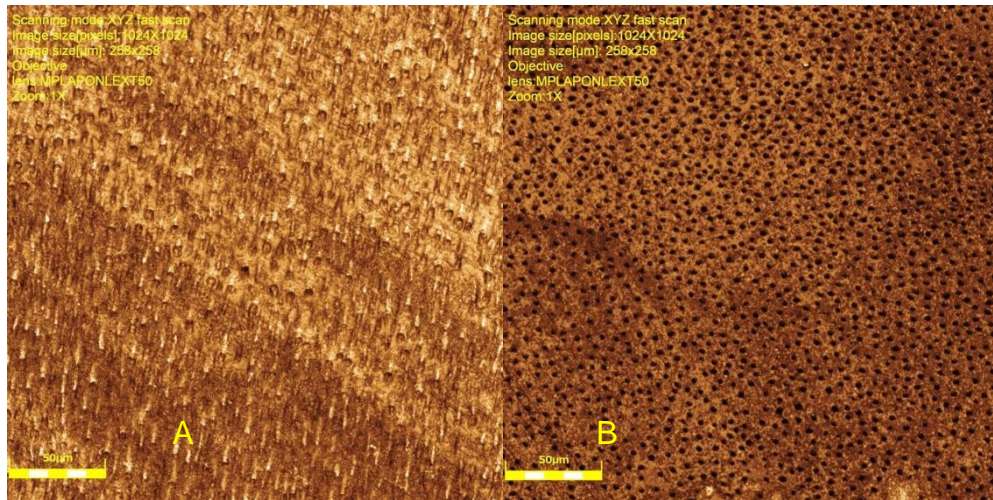


Figura 10- Imagem representativa da superfície dentinária analisada por meio da Microscopia Confocal. (A) antes do condicionamento ácido e (B) após condicionamento com ácido fosfórico 37% (aumento -1040x)

A figura 11 mostra a superfície das amostras tratadas com Clorexidina 2%. Pode-se observar que as embocaduras dos túbulos dentinários ficaram parcialmente obliterados, tendo uma camada amorfa sobre a superfície dentinária tratada, não homogênea, apresentou-se uma camada amorfa em algumas regiões. Em algumas áreas observou que aparentemente a aplicação não foi uniforme (Figura 11 A e 11B).

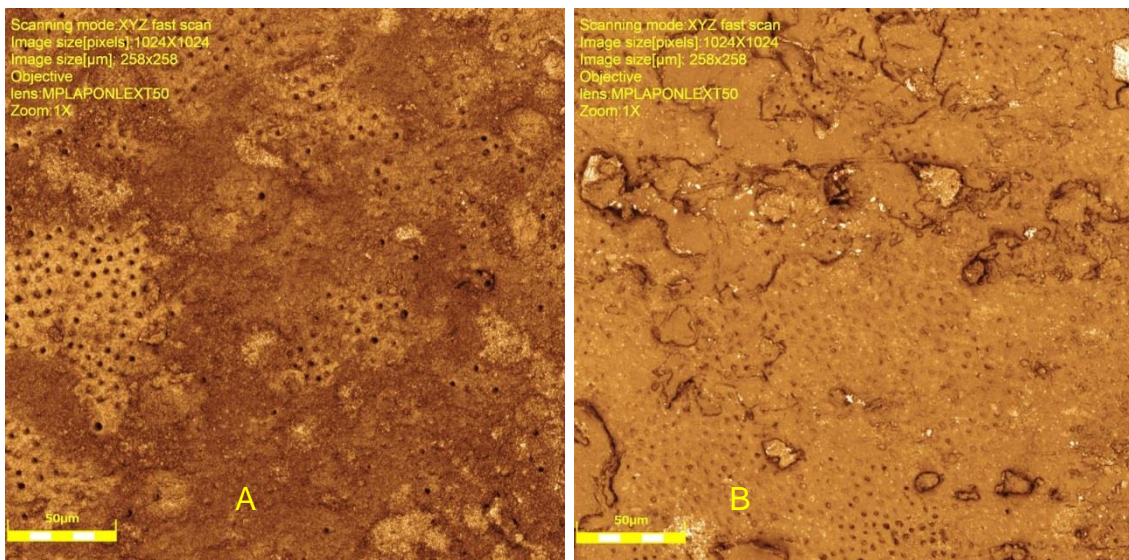


Figura 11- Imagem representativa, por meio da Microscopia Confocal, a superfície dentinária após aplicação de Clorexidina 2% (A) e (B)

A figura 12 representa as amostras após aplicação do primer experimental de quitosana nanoparticulada. Do mesmo modo que no grupo Clorexidina 2%, foi

possível visualizar que a quitosana foi depositada na superfície da dentina, promovendo obliteração parcial das embocaduras dos túbulos dentinários, porém de maneira mais sutil, (Figura 12 A e 12B), porém sem significância estatística (figura13).

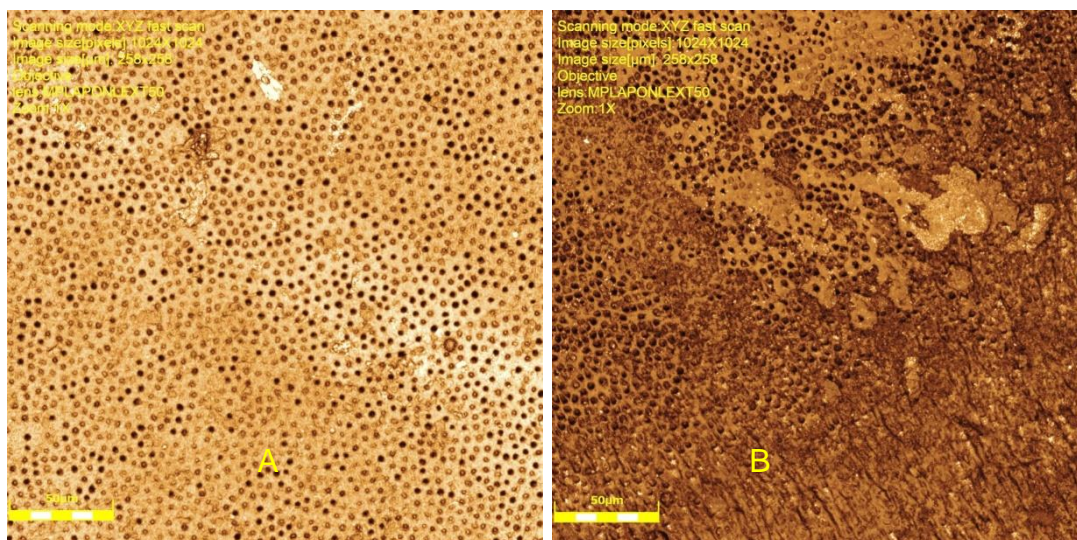


Figura-12 Imagem representativa, por meio da Microscopia Confocal, a Superfície dentiária após aplicação de primer experimental de quitosa nanoparticulada (A) e (B)

Na análise dos dados pode-se observar diferença estatisticamente significativa na contagem de túbulos dentinários apenas no Grupo 2 (condicionamento com ácido fosfórico a 37%), (figura 13) em comparação aos demais grupos (G1, G3 e G4) ($p=0,0001$). Portanto, os grupos Clorexidina e primer de quitosana não demonstram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos demais grupos analisados tabela 1.

Grupo	N	Média	Agrupamento
G2	6	1149	A
G1	6	528	B
G4	6	416	B
G3	6	269	B

Tabela 1. Médias dos grupos em comparações Emparelhadas de Tukey
*Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

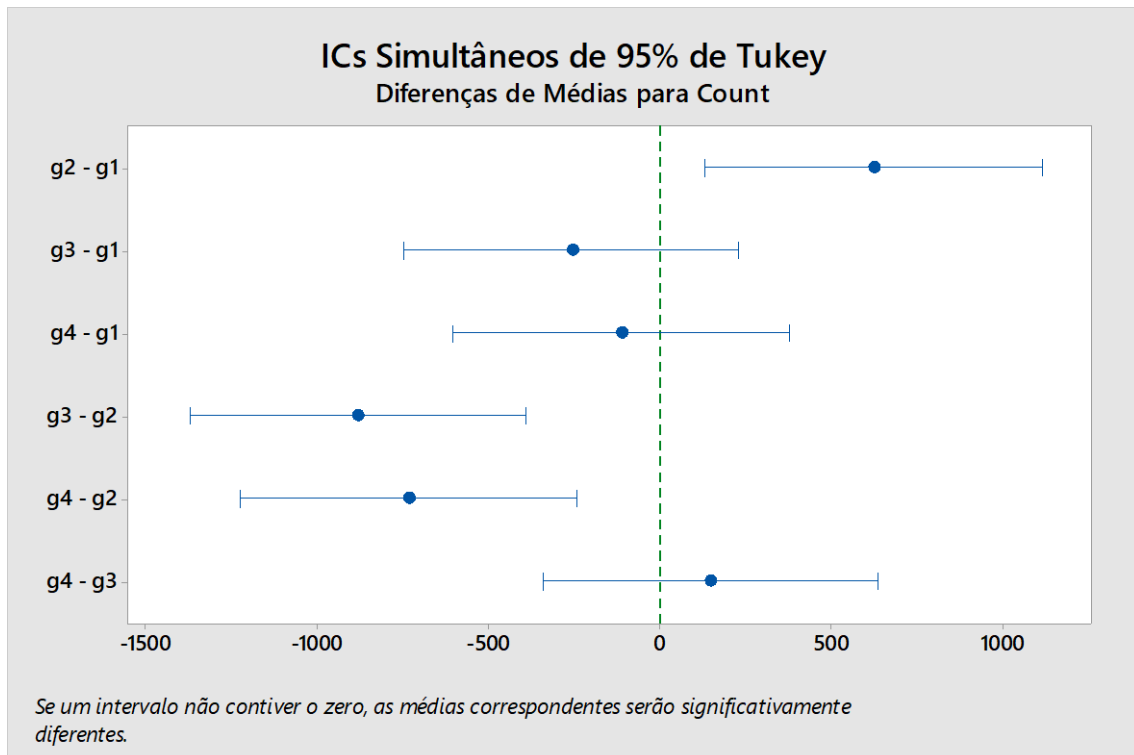


Figura 13- Imagem representativa da comparação entre os grupos analisados, referente à contagem dos túbulos dentinários por meio de Microscopia Confocal.

Em relação à análise da área de dentina não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,180$) o mesmo aconteceu com relação ao perímetro ($p=0,250$), a proporção da área ($p=0,054$) e diâmetro máximo de túbulos dentinários, ($p=0,309$) que podem ser observados nas tabelas 2 e 3.

Área [μm^2] versus grupo					Perímetro [μm] versus grupo				
Grupo	N	Mediana	Posto médio	Valor-Z	Grupo	N	Mediana	Posto médio	Valor-Z
g1	6	2,30761	11,0	-0,42	g1	6	6,59773	11,5	-0,40
g2	5	4,58080	17,8	2,16	g2	6	8,65846	17,5	2,00
g3	6	2,05799	9,3	-1,12	g3	6	6,18953	10,8	-0,67
g4	6	2,26545	10,8	-0,49	g4	6	6,83385	10,2	-0,93
GL		Valor H		Valor-p	GL		Valor H		Valor-p
3		4,89		0,180	3		4,11		0,250

Tabela 2. Tabela representativa da média para a área e o perímetro dos túbulos dentinários e o valor de p ($p>0,05$) respectivamente.

Proporção de área [%] versus grupo					Máximo diâmetro [μm] versus grupo				
Grupo	N	Mediana	Posto médio	Valor-Z	Grupo	N	Mediana	Posto médio	Valor-Z
g1	6	0,0034696	12,2	-0,13	g1	6	2,38714	11,7	-0,33
g2	6	0,0069555	19,0	2,60	g2	6	2,86069	17,2	1,87
g3	6	0,0030943	10,5	-0,80	g3	6	2,19212	10,3	-0,87
g4	6	0,0030209	8,3	-1,67	g4	6	2,29892	10,8	-0,67
GL		Valor H		Valor-p	GL		Valor H		Valor-p
3		7,65		0,054	3		3,59		0,309

Tabela 3. Tabela representativa da média para a média e o máximo diâmetro dos túbulos dentinários e o valor de p ($p > 0,05$) respectivamente.

5. DISCUSSÃO

A adesão de materiais resinosos ao substrato dentário é um tema bastante pesquisado há vários anos, e pode-se considerar que, atualmente, ainda é uma das preocupações da odontologia moderna. Apesar deste mecanismo de união entre sistemas resinosos e o esmalte dentário esteja totalmente consolidado, no que diz respeito à dentina, a confiabilidade e a durabilidade da interface adesiva ainda precisam ser melhoradas (Swift, Perdigão, Heymann, 1995; Perdigão, 2001; Curylofo-Zotti et al., 2019). Também o aumento da versatilidade de agentes de união não é acompanhado por avanços tecnológicos para superar os desafios associados que a técnica necessita, faltam materiais terapêuticos com efeitos bioprotetores e bio-promotores (Chen, 2015).

Assim, este estudo foi realizado com o intuito de possibilitar e viabilizar um novo composto para associação com os sistemas adesivos, a fim de contribuir para a longevidade das restaurações. Portanto, o objetivo do presente estudo, foi avaliar a interação do uso do primer experimental de quitosana nanoparticulada a 2% e a Clorexidina 2% na composição química da superfície dentinária, partindo da hipótese nula de que não haveria alteração desta superfície, independente da substância utilizada.

Este trabalho levou em consideração o estudo anterior realizado no grupo de pesquisa dessa faculdade, Neves 2018, que sintetizou e caracterizou um primer experimental contendo nanopartículas de quitosana. Algumas de suas principais propriedades foram avaliadas, como atividade antimicrobiana e realização de teste de microtração e caracterização do primer por meio de espelhamento de luz dinâmica e ensaio da atividade de MMPs, por meio da análise de Zimografia *in situ* nas concentrações 0,4%; 0,6% e 2%. Concluindo que o primer com a concentração 2% apresentou maior efetividade de inativação de MMPs na matriz dentinária. Deste modo, foi possível estabelecer a concentração do primer experimental de quitosana utilizada neste estudo.

A compreensão dos mecanismos que envolvem a degradação proteolítica das interfaces adesivas à dentina tem sido de fundamental importância, no intuito de prevenir uma das principais causas de degradação desta interface adesiva, como o caso das enzimas proteolíticas, as matrizes de metaloproteinases (MMPs), no qual

foram identificadas em dentina e consideradas como responsáveis pela degradação das fibrilas de colágeno expostas na interface adesiva (Breschi et al. 2017; Chinelatti et al., 2007; Menezello, et al., 2017; Torres et al. 2018).

Além disso, as restaurações adesivas são ainda vulneráveis à fadiga mecânica e hidráulica, bem como à degradação de proteases derivadas do hospedeiro com atividade colagenolítica. Há também uma diminuição na concentração de monômeros no interior da dentina condicionada por ácido e posteriormente eluição do adesivo a partir de higrógelis poliméricos hidroliticamente instáveis das camadas híbridas, o que possivelmente deixam tais fibrilas de colágeno expostas e vulneráveis a degradação por ação das MMPs (Nishitani et al. 2006; Pashley et al., 2011; Liu et al., 2011).

Em humanos, são encontrados 23 tipos de MMPs divididas em grupos, as collagenases, gelatinases, estroelisinases, matrisinas e outras MMPs baseadas em substratos específicos (Murphy, 1995). É importante relatar que as MMPs são identificadas em lesões de cárie dentária, diante de uma queda do pH, na presença de ácidos, as formas latentes dessas enzimas tornam-se ativas nos desafios cariogênicos.

Como foi dito anteriormente, a adesão imediata à dentina tem sido satisfatória, porém de longevidade questionável. Com o intuito de entender a ação das MMPs, muitos trabalhos foram realizados para desvendar o poder inibitório da atividade colagenolítica dessas enzimas em substratos dentais, por meio de aplicação de inibidores de MMPs em dentina condicionada. Como a Clorexidina, agente que atua para aumentar a resistência a degradação enzimática na interface adesiva, e que demonstrou capacidade inibitória da atividade proteolítica das MMPs, principalmente das MMP -2, -8 e catepsinas e cisteinas, demonstrando ser benéfica na estabilidade da camada híbrida (Hebling, Pashley, Tjäderhane, Tay, 2006; Carrilho et al. 2007; Frassetto et al., 2015; Breschi et al. 2017).

Como a Clorexidina foi um dos primeiros inibidores de proteases avaliados em Odontologia, nos últimos anos esta é a substância mais amplamente analisada e empregada para essa finalidade (Menezello, et al., 2017; Malaquias et al. 2018). Foi demonstrado em estudos in vitro que a aplicação da solução de CHX não influencia na resistência da união ao substrato dental (Louguercio et al., 2016), portanto foi escolhida como a solução utilizada para comparar os efeitos da interação química

em substrato dentinário neste estudo, no qual foram comparadas com o primer de quitosana nanoparticulada 2%.

Uma vez que este primer experimental, em estudo anterior deste grupo de pesquisa, demonstrou que o mesmo não interferiu negativamente na força de união, apresentou atividade antimicrobiana e inativou MMPs da matriz dentinária, havia a necessidade de avaliar quimicamente a interação este composto com o substrato dentinário. Assim, foi realizada a análise química da dentina por meio da espectroscopia no infravermelho por transformada (FTIR), que identifica compostos químicos pela interação do comprimento de onda emitido entre 4000 a 400 cm^{-1} e o substrato analisado, resultando em espectros de absorção constituídos pela somatória das bandas de absorção originárias dos compostos químicos presentes no substrato. A análise também possibilita avaliar o colágeno da dentina de variadas formas, podendo desvendar, como acontece à degradação do colágeno (Almeida et al.; 2010). Além disso, O FTIR é uma ferramenta que permite estudar o substrato sem destruição dos espécimes (Lopes et al; 2018). Devido a preservação das amostras, os mesmos três espécimes de cada grupo foram analisados nas três etapas da pesquisa, ou seja, tecido dentinário sadio (superfície sem tratamento); tecido dentinário após condicionamento ácido; e após o tratamento da superfície com o primer experimental de quitosana nanoparticulada e após aplicação de clorexidina 2%.

Nos resultados obtidos por FTIR foi possível observar semelhança na leitura dos espectros em dois momentos. Na leitura da superfície dentinária sem nenhum tipo de tratamento, na qual a relação fosfato se encontra normalizada e após o condicionamento da superfície com ácido fosfórico a 37% que demonstrou diminuição de matéria inorgânica nas 6 amostras analisadas, representando diminuição na quantidade de fosfato e carbonato, sendo assim é possível afirmar que o conteúdo orgânico ficou evidente em relação ao fosfato, resultante da exposição das fibras criando ricas superfícies colágenas devido à remoção total da “*smear layer*”, da dentina peritubular e intertubular, comparado com o tecido sem tratamento da superfície, como demonstrado também em outros estudos do substrato dentinário após o condicionamento ácido (Leinfelder, 1994; Sofan et al.; 2017).

No delineamento experimental, a aplicação da CHX e do primer de quitosana após o condicionamento ácido, foi determinada baseada em estudos que demonstraram maiores benefícios sobre as fibrilas de colágeno expostas após esse condicionamento (Gendron et al.; Scaffa et al., 2012; Curylofo-Zotti et al., 2019).

No gráfico 7 que evidencia as bandas da matriz orgânica do tecido, após tratamento da superfície dentinária com Clorexidina, foi possível observar o aumento das bandas de 1050 a 900 cm^{-1} e os picos espectrais entre os valores médios das bandas de dentina sem tratamento e após condicionamento ácido, tal fato se justifica, e estão de acordo com estudos semelhantes, de (Kim et al. 2010), no qual foi detectada a absorção de CHX na superfície dentinária e sobreposição de bandas de absorção de CHX, e deslocamento das bandas de amida III e carbonato da dentina devido à interação química, demonstrando afinidade com a estrutura dentária, pois as cargas da CHX podem se ligar ao fosfato (Malaquias et al., 2018), e eletrostaticamente por ligação de hidrogênio às cargas negativas dos grupos carboxila de aminoácidos do colágeno e proteínas expostas não colágenas associadas. Assim como, no estudo de Tartari et al., 2018, que demonstrou nos espectros das amostras de dentina previamente desmineralizadas, que a aplicação de CHX apresentou maior ligação à esta dentina, quando comparada à dentina mineralizada e a outras soluções utilizadas no estudo. Tal fato pode ser explicado uma vez que a CHX se difunde através da matriz de colágeno e permanece presa dentro dos espaços entre as fibrilas de colágeno, como sugeriu o estudo de Kim et al., (2010), ou seja, quanto maior a área da matriz de colágeno exposta para a CHX penetrar, conseqüentemente terá maior quantidade de CHX presente em superfície dentinária (Sanabe, Costa, Hebling, 2011).

Ao analisar os dados da FTIR após o tratamento da amostra com o primer experimental de quitosana nanoparticulada 2%, houve reposição de minerais na superfície dentinária, verificados no valor das bandas entre 1120 a 1030 cm^{-1} aproximadamente, isso se justifica possivelmente ao fato da capacidade da molécula de quitosana se ligar a uma grande variedade compostos de maneira praticamente ilimitada (Pighinelli e Kucharska, 2013) e ainda os grupos laterais dessa molécula podem ser escolhidos para fornecer funcionalidade específica, alterar propriedades biológicas ou modificar propriedades físicas, o que demonstra ter boa capacidade de se formar complexos com substâncias inorgânicas e bioquímicas, tais como ligações

de hidrogênio e hidroxiapatita, e ligações iônicas, favorecendo a biomineralização (Rinaudo, 2006; Pighinelli e Kucharska, 2013).

Há também interação entre quitosana e colágeno (dois polímeros com carga específica) demonstrado em estudos *in vitro* que observaram a formação de um complexo insolúvel contendo os dois polímeros (Kishen et al., 2016), o que pode sugerir a possibilidade de aumentar estabilidade da interface resina-dentina (Curylofo-Zotti et al., 2019).

A microscopia Confocal a laser, metodologia utilizada para análise da superfície dentinária neste estudo, devido a possibilidade de obtenção de imagens em alta resolução, permitiu a visualização da topografia superficial do substrato além da quantificação do número de túbulos dentinários, perímetro, área e diâmetro. Nas imagens obtidas é notável visual diferença entre a superfície dentinária após aplicação de Clorexidina, que demonstra um aspecto de obliteração parcial dos túbulos dentinários, em comparação a imagem após condicionamento com ácido fosfórico, o que pode sugerir problemas em relação a adesão dos materiais resinosos nessa superfície. Porém, a imagem não está de acordo com estudos realizados por outros autores em que a resistência de união em dentina previamente tratada com CHX, não demonstrou diminuição significativa da mesma (Carrilho et al., 2007; Montagner, Sarkis-Onofre, Pereira-Cenci, Cenci 2014; Menezello et al., 2017).

Em comparação com as imagens após aplicação do primer de quitosana nanoparticulada, estas indicam uma menor obliteração dos túbulos dentinário. Esta obliteração parcial sugere que o contato do primer de biopolímero em superfície dentinária provoca uma interação química com o substrato. Porém, os dados estatísticos dos resultados da microscopia confocal no presente trabalho, não nos dão diferenças importantes, apenas com relação ao número de túbulos dentinários expostos em dentina condicionada (figura13), como esperado, (Fusayama, 1979; Nakabayashi, 1982; Sofan, 2017). As imagens do confocal corroboram com os dados do FTIR, de que após aplicação do primer experimental a superfície dentinária exibe aspecto melhorado, entretanto, não suficientemente evidente. Para sanar tais dúvidas, a alternativa provável compreende em estabelecer maior número de amostras por grupo.

Portanto, levando-se em consideração os dados do FTIR pode-se sugerir que tal fato ocorra devido a ligações de hidrogênio intra/intermolecular, pois há grande

número de hidroxilas (OH^-) presentes nas cadeias moleculares da quitosana, além de uma ligação de hidrogênio extensa (Raafat e Sahl, 2009; Pighinelli, Kurcharska, 2012).

Sendo assim, ainda pode-se considerar que aplicação do primer de quitosana nanoparticulada em superfície dentinária pós-condicionamento ácido parece ser benéfica (Curylofo-Zotti, 2019), devido a melhor interação da substância nesta superfície quando comparada a Clorexidina. Deve-se ressaltar ainda a importância e a tendência de substituição de materiais sintéticos pelos materiais bioativos e naturais que estão sendo atualmente muito estudados e paulatinamente lançados no comércio. Assim, este primer experimental com quitosana nanoparticulada demonstra ser uma excelente opção, visto que a quitosana é um material abundante na natureza, tornando produtos a base deste biopolímero economicamente viável, somando ainda as características da quitosana, tais como boas propriedades físico-químicas e biológicas, além de atoxicidade, alergenicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade.

6. CONCLUSÃO

Diante da proposição e dos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que o primer de quitosana nanoparticulada interfere de maneira benéfica e sutil na superfície dentinária, demonstrou ser mais bem depositada nos túbulos dentinários com relação a clorexidina, porém sem significância estatística.

Este estudo agregado às pesquisas anteriores proporciona mais uma evidência da possibilidade, no futuro, do emprego de um produto biocompatível na odontologia, necessitando de estudos clínicos e de longa duração para concretização sua efetividade.

REFERÊNCIAS

Araújo MAM, Bottino MA. Como melhor explorar os adesivos dentinários nos procedimentos restauradores. Atualização na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas, 1998.

Assis LM, Zavareze ER, Prentice-Hernández C, Souza-Soares, LA - Review: Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. Braz J Food Technol. 2012; 15(2): 99-109.

Barkmeier WW, Cooley, RL. Laboratory evaluation of adhesive systems. Oper Dent. 1992; (5): p.50-61.

Benetti AR, Ribeiro de Jesus VC, Martinelli NL, Pascotto RC, Poli-Frederico RC. Colour stability, sating and roughness of silorane after prolonged chemical challenges. J Dent, 2013 (12): 1229-35.

Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. Int J Oral Sci. 2011; (4):192-9.

Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo E, Pashley D. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. Dental Materials. 2010; 26(4):320-325.

Breschi, L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, Cadenaro M, Foulger S, Mazzoti G, Tay FR, DI Lenarda R, Pashley, D. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. J Adhes Dent. 2009;(11):191–8.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. J Dent Res. 1955 Dec;34(6):849-53.

Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009;90:373–380.

Carsdoso M, Vieira, LCC. Infiltração marginal em cavidades classe II MOD em pré-molares. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1998; 52(1): 65-9.

Curylofo-Zotti FA; Scheffe DB; Macedo AP; Souza-Gabriel AE; Hebling J; Corona SAM. Effect of Er:YAG laser irradiation and chitosan biomodification on the stability of resin/demineralized bovine dentin bond. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 91 (2019) 220–228.

De Munick J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. J Dent Res. 2003;82(2):136-40.

Fusayama, T. et al. Non pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J. Dent. Res.*, v.58, p.1364-70, 1979.

García-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Feilzer A, Tjäderhane L, Pashley EL. (Degradation of resin-bonded human dentine after 3 years of storage. *Am J Dent.* 2007 Apr;20(2):109-13.

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D- Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999 May;6(3):437-9.

Gonçalves, SEP, Araújo, MAM, Padilha, RQ,.Adesivos multi-uso: avaliação da resistência adesiva à dentina ante o teste de cisalhamento. *Rev Odontol UNESP.*1996;(25)113-21.

Gondim BLC, Castellano LRC, de Castro RD, Machado G, Carlo HL, Valença AMG, de Carvalho FG. Effect of chitosan nanoparticles on the inhibition of *Candida* spp. biofilm on denture base surface. *Arch Oral Biol.* 2018; 9(94):99-107.

Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, Carrilho M, Tjäderhane L, Buzalaf MA. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.* 2011;45(5): 429-34.

Kim J, Toshikazu U, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L. et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater.* 2010 Aug;26(8):771-8.

Kishen A, Shi Z, Sherestha A, Neoh K, An Investigation on the Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of Cationic Nanoparticulates for Root Canal Disinfection. *J Endod.* 2008 Dec; 34(12):1515-20.

Kishen A, Shrestha S, Sherestha A, Cheng C, Goh C, Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dent Mater.*2016; 32(8): 968-77.

Krifka S, G. Spagnuolo, Shamalz G, Sheweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials*, 34 (2013), pp. 4555-4563.

Leinfelder, K. Dentin adhesives: the newest generation. *Esthet. Dent. Update.* (Philadelphia), v.5, p.50-2, 1994.

Malaquias P, Gutierrez MF, Hass V, Stanislawczuk R, Bandeca MC, Arrais CAG, et al. Two-year Effects of Chlorhexidine-containing Adhesives on the In Vitro Durability of Resin-dentin Interfaces and Modeling of Drug Release. *Operative Dentistry*, 2018, 43-2, 201-212

Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. -The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997 Nov; 25(6):441-58.

Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP Activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res.* 2012; 91(5):467-472.

Menezello SA, França FMG, Basting RT, Turssi CP, Souza-Gabriel A, Palma-Dibb RG, Amaral FLB. Effect of chlorhexidine application or Nd:YAG laser irradiation on long-term bond strength of a self-etching adhesive system to dentin. *Laser Dent Sci* (2017) 1:41–46.

Montagner AF, Sarkis-Onofre R, Pereira-Cenci T, Cenci MS. MMP Inhibitors on Dentin Stability: A Systematic Review and Meta-analysis *J Dent Res.* Ago 2014; 93 (8): 733-43.

Muzzareli RA, Ferrero A, Pizzoli M. Light-scattering, X-ray diffraction, elemental analysis and infrared spectro- photometry characterization of chitosan, a chelating polymer. *Talanta.* 1972 Oct;19(10):1222-6.

Nakabayashi, N. et al. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* , v.16, n.3, p. 265-73, 1982.

Neves, JG. Efeito da incorporação de nanopartículas de quitosana no sistema adesivo universal sob a inibição de metaloproteínas presentes na matriz dentinária . Tese [Doutorado em Odontopediatria] Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP- USP, Brasil; 2018.

Oda M, Zárate-Pereira P, Matson E. In vitro study of the microleakage in cavities submitted to treatment with Er:YAG laser and restored with aesthetic materials. *Pesqui Odontol Bras.* 2001 Oct-Dec;15(4):290-5.

Opdam N, van de Sande F, Bronkhorst E, Bottenberg P, Cenci M, Gaengler P, et al. Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res.* 2014; 94: 943–949.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83(3):216-21. Sofan E; Sofan A; Palaia G , Tenore G, Romeo U , Migliaiu G. *Ann Stomatol (Roma)* . 2017 Jan-Mar; 8 (1): 1-17.

Pighinelli L, Kucharska M. Chitosan–hydroxyapatite composites. *Carbohydrate Polymers.*V 93, March 2013, p. 256-262.

Pivetta TP, Simões S, Araújo MM, Carvalho T, Arruda C, Marcato PD. Development of nanoparticles from natural lipids for topical delivery of thymol: Investigation of its

anti-inflammatory properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 164, 1 April 2018, p. 281-290.

Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey. March 2009. *Microbial Biotechnology* 2(2):186-20.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. v. 31, July 2006, p.603-632.

Sofan E, Sofan A, Palaia G, Tenore G, Romeo U, Migliau G. Classification review of dental adhesive systems: from the IV generation to the universal type. *Ann Stomatol*. 2017 Jul 3;8(1):1-17.

Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002;81(9):603-7.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2007; 52:121–127.

Taube F, Ylmén R, Shchukarev A, Nietzsche S, Norén JG. Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents. *J Dent*. 2010 Jan;38(1):72-81.

Tavaria FK, Costa EM, Pina-Vaz I, Carvalho MF, Pintado MM. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. *Braz J Biom Eng*. 2013 Mar; 29(1), 110-120.

Tekçe N, Tuncer S, Demirci M, Balci S. Do Matrix Metalloproteinase Inhibitors Improve the Bond Durability of Universal Dental Adhesives? *Scanning* 2016; (9999) 1-1.

Tiana K, Pengb M, Feic W, Liao C, Ren X. Induced Synthesis of Hydroxyapatite by Chitosan for Enamel Remineralization. *Advanced Materials Research*. 2012; 530:40-45.

Tjäderhane L. Dentin Bonding: Can We Make it Last? *Oper Dent*. 2015 Jan-Feb;40(1):4-18.

Zhang J, Boyes V, Festy F, Richard J.M. Lynchc, RJM, Watson TF, Banerjee A. In-vitro subsurface remineralisation of artificial enamel white spot lesions pre-treated with chitosan. *Dental Materials*. 2018; 34:1154–1167.

Zheng P, Chen H. Evaluate the effect of different mmps inhibitors on adhesive physical properties of dental adhesives, bond strength and mmp substarte activity. *Sci Rep*. 2017; 10;7(1):4975.

Zheng P, Zaruba M, Attin T, Wiegand A. Effect of different matrix metalloproteinase inhibitors on microtensile bond strength of an etch-and-rinse and a self-etching adhesive to dentin. *Oper Dent* 2015;40(1):80-6.

