



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**MINERALIZAÇÃO DE DENTINA PROFUNDA NA PRESENÇA DE  
AGENTES DE RETICULAÇÃO — UM ESTUDO *EX VIVO***

Trabalho submetido por

**Beatriz Amorim de Barros Ferreira Igrejas**

para obtenção do grau de Mestre de Medicina Dentária

**outubro de 2021**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**MINERALIZAÇÃO DE DENTINA PROFUNDA NA PRESENÇA DE  
AGENTES DE RETICULAÇÃO — UM ESTUDO *EX VIVO***

Trabalho submetido por

**Beatriz Amorim de Barros Ferreira Igrejas**

para obtenção de grau de Mestre de Medicina Dentária

Trabalho orientado por

**Prof. Doutora Carla Ascenso**

e coorientado por

**Mestre Joana Carmo**

**outubro de 2021**



## DEDICATÓRIA

*“Não é o trabalho, mas o saber trabalhar, que é o segredo do êxito no trabalho. Saber trabalhar quer dizer: não fazer um esforço inútil, persistir no esforço até ao fim, e saber reconstruir uma orientação quando se verificou que ela era, ou se tornou, errada.”*

*Fernando Pessoa*



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Doutora Carla Ascenso e coorientadora Mestre Joana Carmo por todo o apoio e disponibilidade ao longo deste percurso.

Ao Prof. Doutor Mário Polido pela disponibilização do seu laboratório — *Biomaterials Lab* — onde decorreu toda a investigação.

A todos os professores do IUEM, com os quais tive a honra de me cruzar, por toda a aprendizagem, partilha e oportunidades que me foram dadas.

Ao IUEM e a todos os seus funcionários por me acolherem e tratarem como família no decorrer destes últimos 5 anos.

Aos meus pais, por dedicarem a sua vida à felicidade e bem-estar das filhas. Serei eternamente grata por todo o seu trabalho árduo e pela educação e valores que me transmitiram.

À minha irmã, por estar sempre a meu lado.

À Raquel, a minha “Rachel”, por toda a amizade, as muitas gargalhadas e algumas lágrimas. Foi ela o meu pilar no início desta odisseia.

À Susana, que chegou mais tarde para completar a “pior box de sempre”, a qual não seria a mesma sem ela.

A todos os restantes amigos e colegas que passaram pela minha vida e, de alguma forma, deixaram a sua marca.



## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar o efeito dos agentes de reticulação na mineralização *ex vivo* de dentina profunda, por análise da variação da microdureza de Vickers a fragmentos de dentes tratados de acordo com um protocolo anteriormente desenvolvido (Kakavas, 2020).

**Materiais e métodos:** 50 fragmentos de dentina profunda foram divididos, aleatoriamente, por 5 grupos experimentais (n=10): Grupo Dp0 — dentina profunda sã; Grupo Dp1 — dentina profunda tratada com HCl (10 mM), 60 s; Grupo Dp2 — dentina profunda tratada com HCl e posteriormente com uma solução de cálcio (15,8 mM) em tampão de neutralização pH 7,4 contendo fosfatos (12,6 mM), 72 h a 21 °C; Grupo Dp3 — dentina profunda tratada com HCl, com solução de glutaraldeído (5%) durante 1 h a 37 °C e posteriormente com uma solução de cálcio em tampão de neutralização pH 7,4 contendo fosfatos; Grupo Dp4 — dentina profunda tratada com HCl, com solução de genipina (0,5%) durante 1 h a 37 °C e posteriormente com uma solução de cálcio em tampão de neutralização pH 7,4 contendo fosfatos. Após o tempo de tratamento avaliou-se a microdureza de Vickers dos espécimes e os resultados obtidos foram estatisticamente analisados aplicando o teste ANOVA a um fator.

**Resultados:** A média dos valores médios obtidos para a microdureza de Vickers para a dentina profunda de cada grupo foram: grupo Dp0 — 66,5±5,2 HV; grupo Dp1 — 61,9±6,8 HV; grupo Dp2 — 77,7±8,4 HV; grupo Dp3 — 76,5±8,8 HV; grupo Dp4 — 66,4±8,0 HV.

**Conclusão:** A utilização de uma solução de mineralizante, induziu um aumento na microdureza de Vickers da dentina profunda. No entanto, o glutaraldeído não apresentou qualquer efeito favorecedor da mineralização e o consequente aumento da microdureza. Por outro lado, a adição de genipina parece ter inibido o processo de mineralização da dentina profunda, provocando uma diminuição da microdureza.

**Palavras-chave:** Dentina profunda; Genipina; Glutaraldeído; Remineralização



## ABSTRACT

**Objective:** to evaluate the effect of crosslinking agents on the ex vivo mineralization of deep dentin, by measuring the Vickers microhardness, based on previously obtained results (Kakavas, 2020).

**Materials and methods:** 50 deep dentin fragments were randomly divided into 5 experimental groups (n=10): Group Dp0 — sound deep dentin; Group Dp1 — deep dentin treated with HCl (10 mM), 60 sec; Group Dp2 — deep dentin treated with HCl and subsequently with a calcium solution (15,8 mM) in a pH 7,4 neutralization buffer containing phosphates (12,6 mM), 72 h at 21 °C; Group Dp3 — deep dentin treated with HCl, with a glutaraldehyde solution (5%), for 1 h at 37 °C and later with a calcium solution in a pH 7,4 neutralization buffer containing phosphates; Group Dp4 — deep dentin treated with HCl, with a genipin solution (0,5%), for 1 h at 37 °C and then with a calcium solution in a pH 7,4 neutralization buffer containing phosphates. After the treatment time, the Vickers microhardness of the specimens was evaluated, and the results obtained were statistically related by applying the one-way ANOVA test.

**Results:** The mean of the mean values obtained for the Vickers microhardness for the deep dentin of each group were: Group Dp0 —  $66,5 \pm 5,2$  HV; Group Dp1 —  $61,9 \pm 6,8$  HV; Group Dp2 —  $77,7 \pm 8,4$  HV; Group Dp3 —  $76,5 \pm 8,8$  HV; Group Dp4 —  $66,4 \pm 8,0$  HV.

**Conclusion:** The use of a mineralizing solution induced an increase in the Vickers microhardness of the deep dentin. However, glutaraldehyde did not have any effect that favors mineralization and the consequent increase in microhardness. On the other hand, the addition of genipin seems to have inhibited the mineralization process of deep dentin, causing a decrease in microhardness.

**Keywords:** Deep dentin; Genipin; Glutaraldehyde; Remineralization



## ÍNDICE GERAL

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABELAS .....	9
LISTA DE SIGLAS .....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. DENTINA E SUA ESTRUTURA .....	13
1.2. BIOMINERALIZAÇÃO .....	16
1.2.1. COLAGÊNIO.....	17
1.2.2. NUCLEAÇÃO E HIDROXIAPATITE .....	20
1.2.3. PROTEÍNAS NÃO COLAGÉNICAS (NCPs).....	21
1.3. AGENTES DE RETICULAÇÃO .....	22
1.3.1. GLUTARALDEÍDO .....	23
1.3.2. GENIPINA.....	25
1.4. DESMINERALIZAÇÃO — REMINERALIZAÇÃO.....	26
1.5. MICRODUREZA DA DENTINA .....	27
1.6. PERTINÊNCIA DO ESTUDO .....	27
1.7. OBJETIVOS.....	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
2.1. COMISSÃO DE ÉTICA .....	31
2.2. GRUPOS DE ESTUDO .....	31
2.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	32
2.4. DESINFECÇÃO E ARMAZENAMENTO.....	32
2.5. SECÇÃO DOS DENTES.....	33
2.6. REAGENTES E PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES .....	34
2.7. MÉTODO EXPERIMENTAL .....	37
2.7.1. GRUPO Dp0.....	38

2.7.2. GRUPO Dp1.....	38
2.7.3. GRUPO Dp2.....	39
2.7.4. GRUPO Dp3.....	40
2.7.5. GRUPO Dp4.....	40
2.8. ANÁLISE DA MICRODUREZA DE VICKERS .....	41
3. RESULTADOS .....	43
4. DISCUSSÃO.....	49
4.1. GRUPO Dp1.....	50
4.2. GRUPO Dp2.....	50
4.3. GRUPO Dp3.....	51
4.4. GRUPO Dp4.....	53
4.5. LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	56
5. CONCLUSÃO.....	57
5.1. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	58
6. BIBLIOGRAFIA.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da diferença no número de túbulos dentinários (T) e presença de dentina peritubular (P) e intertubular (I), entre dentina profunda (DP) e a dentina superficial (DS) coronárias (adaptado de Liwei et al., 2016).....	16
Figura 2. Ilustração esquemática da fibrillogênese do colagénio (adaptado de Henriksen et al., 2019).....	18
Figura 3. Ilustração dos buracos de colagénio ( <i>gaps</i> ) e das zonas de sobreposição ( <i>overlaps</i> ) (adaptado de Henriksen et al., 2019). ....	19
Figura 4. Micrómetro de tecidos duros Accutom50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca). .....	33
Figura 5. Representação esquemática do corte dos dentes; (A) constituição dentária: esmalte (E), dentina superficial (DS), dentina profunda (DP); (B) cortes longitudinais; (C) cortes transversais; (D) corte do fragmento de dentina profunda; (E) 4 espécimes de DP.....	34
Figura 6. Máquina circular de polimento (Struer TM, FEPA paper) com disco abrasivo de carbetto de silício.....	34
Figura 7. Diagrama ilustrativo do desenho de estudo. ....	37
Figura 8. Imagem de dentina profunda sã, obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D.....	38
Figura 9. Representação esquemática do método experimental do grupo Dp1: (A) tratamento com solução de HCl, 60 s; (B) lavagem com ddH <sub>2</sub> O, 15 s; (C) teste de microdureza de Vickers.....	39
Figura 10. Representação esquemática do método experimental do grupo Dp2: (A) tratamento com solução de HCl, 60 s; (B) lavagem com ddH <sub>2</sub> O, 15 s; (C) tratamento com solução mineralizante, 72 h; (D) teste de microdureza de Vickers.....	39
Figura 11. Representação esquemática do método experimental do grupo Dp3: (A) tratamento com solução de HCl, 60 s; (B) lavagem com ddH <sub>2</sub> O, 15 s; (C) tratamento com GA, 1 h; (D) lavagem com ddH <sub>2</sub> O; (E) tratamento com solução mineralizante, 72 h; (D) teste de microdureza de Vickers.....	40
Figura 12. Representação esquemática do método experimental do grupo Dp4: (A) tratamento com solução de HCl, 60s; (B) lavagem com ddH <sub>2</sub> O, 15s; (C) tratamento com GE, 1h; (D) lavagem com ddH <sub>2</sub> O; (E) tratamento com solução mineralizante, 72h; (D) teste de microdureza de Vickers.....	41

Figura 13. Vickers Hardness Tester — HSV-30 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). .....	42
Figura 14. Exemplo de indentação em dentina profunda no teste de microdureza de Vickers, com visualização dos túbulos dentinários.....	42
Figura 15. Controlo de pH às 72 horas. ....	43
Figura 16. Aumento da turbidez da solução após a execução do passo de mineralização, às 72 h, nos grupos Dp2, Dp3 e Dp4 (da esquerda para a direita). ....	43
Figura 17. Formação de pigmento azul num espécime do grupo Dp4 após a execução do passo de mineralização, às 72 h. ....	44
Figura 18. Gráfico da variação dos valores médios de microdureza (HV) obtidos para os vários grupos de dentina profunda ( <i>output</i> da análise descritiva recorrendo ao <i>software</i> SPSS).....	48

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de estudo. Glutaraldeído (GA); genipina (GE); tampão de neutralização (TN).....	32
Tabela 2. Reagentes utilizados no estudo experimental.....	35
Tabela 3. Soluções preparadas para o estudo experimental. ....	36
Tabela 4. Estatística descritiva dos grupos de estudo Dp0–Dp4 ( <i>output</i> obtido recorrendo ao <i>software</i> de análise estatística SPSS). ....	44
Tabela 5. Teste de normalidade — teste de Shapiro-Wilk ( <i>output</i> obtido recorrendo ao <i>software</i> de análise estatística SPSS). ....	45
Tabela 6. Teste de homogeneidade de variâncias — teste de Levene ( <i>output</i> obtido recorrendo ao <i>software</i> de análise estatística SPSS). ....	46
Tabela 7. Teste ANOVA a um fator ( <i>output</i> obtido recorrendo ao <i>software</i> de análise estatística SPSS).....	46
Tabela 8. Teste de Bonferroni para comparações múltiplas ( <i>output</i> obtido recorrendo ao <i>software</i> de análise estatística SPSS). ....	47



## LISTA DE SIGLAS

- ACP — Fosfato de cálcio amorfo
- ANOVA — *Analysis of Variance*
- BSP — Fosfoproteína óssea
- DGP — Glicoproteína dentinária
- DMP-1 — Proteína da matriz de dentina 1
- DP — Dentina profunda
- DPP — Fosfoproteína da dentina
- DS — Dentina superficial
- DSP — Sialoproteína dentinária
- DSPP — Sialofosfoproteína dentinária
- E — Esmalte
- EDS - Espectroscopia de energia dispersiva
- GA — Glutaraldeído
- GE — Genipina
- HA — Hidroxiapatite
- HEMA — 2-hydroxyethyl methacrylate
- ISO — *International Organization for Standardization*
- JAD — Junção amelodentinária
- JAC — Junção amelocimentária
- JCD — Junção cimentodentinária
- KHN — *Kooper Hardness* (unidade de dureza de Vickers)
- MEPE — Fosfoglicoproteína da matriz extracelular
- MEV — Microscopia eletrônica de varrimento
- MMPs — Metaloproteinases
- MTT — 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
- NCPs — Proteínas não colagénicas
- OCP — Fosfato octacálcio
- OPN — Osteopontina
- SIBLING — Pequenas glicoproteínas ligadas à integrina com N ligantes
- SPSS — *Statistical Package for the Social Science*
- TN — Tampão de neutralização
- VH — *Vickers Hardness* (unidade de dureza de Vickers)



## 1. INTRODUÇÃO

Os dentes são tecidos altamente mineralizados, estando por isso, constantemente sujeitos a processos de desmineralização e remineralização (He et al., 2019). A biomineralização é um processo orgânico complexo e dinâmico no qual ocorre a formação de cristais minerais numa matriz orgânica para originar tecidos biológicos híbridos, como a dentina, sendo a sua compreensão fundamental para o desenvolvimento e inovação do tratamento de condições patológicas como a doença de cárie (Abou Neel et al., 2016; Di Foggia et al., 2019).

O colagénio tipo I é o principal componente da matriz orgânica da dentina e o arranjo tridimensional das suas fibras forma uma estrutura altamente organizada, onde ocorre formação de hidroxiapatite (HA) a partir de iões cálcio, de iões fosfato e de iões hidroxilo (Abou Neel et al., 2016; Tomoia & Pasca, 2015). Esta estrutura orgânica é estabilizada por ligações de hidrogénio e cruzadas (ou de *crosslink*), inter e intracadeais, cuja formação pode ser adicionalmente induzida por agentes de reticulação (ou de *crosslink*) de colagénio extrínsecos, como o glutaraldeído e a genipina (Abou Neel et al., 2016; Al-Ammar et al., 2009).

### 1.1. DENTINA E SUA ESTRUTURA

A dentina é um complexo hidratado constituído em peso por 70% de matriz inorgânica, cujo principal componente é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (hidroxiapatite/HA), 20% de matriz orgânica e os restantes 10% de água (Cao et al., 2015). 91% da matriz orgânica é constituída por colagénio, maioritariamente do tipo I, e em menor quantidade do tipo V. Os componentes da matriz não colagénica incluem fosfoproteínas, proteoglicanos, proteínas contendo gama-carboxiglutamato (proteínas Gla), glicoproteínas ácidas, fatores de crescimento e lípidos. Já em volume, a matéria inorgânica representa 45% da dentina, enquanto as moléculas orgânicas e a água 33% e 22%, respetivamente (Liwei et al., 2016). Segundo a literatura, este tecido biológico pode ser dividido em 5 tipos diferentes: junções amelodentinária (JAD) e cimentodentinária (JCD), dentina do manto, dentina primária, dentina secundária e dentina terciária (Tjäderhane et al., 2012). Podemos ainda distinguir 3 tipos de dentina: dentina do manto, dentina circumpulpar e pré-dentina. A dentina do manto é a primeira a formar-se e está localizada subjacentemente ao esmalte

e cimento e, após a sua deposição, é então formada a dentina circumpulpar, que constitui a maioria da dentina e é essencialmente constituída por fibrilhas de colagénio. A pré-dentina consiste numa matriz orgânica não mineralizada de dentina, situada entre a camada de odontoblastos e dentina mineralizada (Liwei et al., 2016). A dentina circumpulpar é composta por quatro elementos: (1) túbulos orientados rodeados por (2) uma zona peritubular altamente mineralizada embutida em uma matriz intertubular consistindo em grande parte de (3) colagénio tipo I com cristais de apatite e (4) fluido dentinário (Marshall, 1993).

A presença de túbulos é uma característica central da dentina, afetando, por exemplo, as suas propriedades mecânicas, a sua capacidade de resistir às forças oclusais e seu comportamento na adesão (Tjäderhane et al., 2012). Os túbulos dentinários resultam dos processos odontoblásticos, atravessando toda a extensão da dentina desde a JAD ou JCD até à frente de mineralização e, ao aproximarem-se da mesma, convergem, uma vez que a superfície da câmara pulpar contempla uma área muito menor que a área da superfície de dentina ao longo da JAD (Liwei et al., 2016). Estão normalmente preenchidos, pelo menos em parte, por fluido proveniente dos odontoblastos (Marshall, 1993) e, sendo estruturas cónicas, são maiores perto da polpa e mais finos na junção amelodentinária (Liwei et al., 2016). Os túbulos seguem um percurso em forma de “S” da periferia da dentina até à zona da polpa da dentina coronal, resultando estas curvaturas da aglomeração e do caminho seguido pelos odontoblastos à medida que se movem em direção ao centro da polpa (Nanci, 2017). Os túbulos dentinários não são tubos lisos, mas sim canais que possuem paredes irregulares com vários ramos laterais e microcanais que se ligam a túbulos adjacentes. O número de ramificações é maior nas zonas onde a densidade tubular é menor (Pashley, 1989; Mjör & Nordhal, 1996).

Os túbulos são delimitados por um colar de matriz mais mineralizada, denominado dentina peritubular, que começa perto da frente da mineralização (Nanci, 2017). Este tipo de dentina é depositado na face interna do lúmen tubular pelos odontoblastos posteriormente à formação de dentina intertubular, mas o seu mecanismo de formação e a sua composição exata ainda não estão completamente estabelecidas (Nanci, 2017; Tjäderhane et al., 2012). É nitidamente distinta da dentina intertubular, sendo mais mineralizada, praticamente livre de matriz colagénica e com maior proporção de proteoglicanos sulfatados. A dentina peritubular considera-se ser essencialmente constituída por HA (Pashley, 1989; Tjäderhane et al., 2012; Liwei, et al, 2016), embora

possa variar significativamente a sua simetria e o seu grau de mineralização possam variar significativamente (Tjäderhane et al., 2012).

A dentina intertubular compreende a maior parte do volume dentinário, constituindo o centro da dentina circumpulpar. Está localizada entre os túbulos dentinários e a sua matriz orgânica consiste principalmente em fibras de colagénio orientadas aleatoriamente em ângulos retos com os túbulos dentinários (Liwei et al., 2016; Nanci, 2017). A dentina intertubular é formada pelo odontoblasto durante a dentinogénese e forma-se por meio da mineralização da pré-dentina (Tjäderhane et al., 2012). A dentina intertubular representa o produto formativo primário dos odontoblastos e consiste numa rede entrelaçada de fibras de colagénio tipo I (50 a 200 nm de diâmetro) dentro e ao redor das quais os cristais de apatite são depositados (Nanci, 2017).

Existem diferenças entre a estrutura da dentina superficial e profunda, pois as quantidades relativas das áreas tubular, peritubular e intertubular variam drasticamente (figura 1), devido ao arranjo estrutural provocado pelas células formativas (Marshall, 1993). À medida que a distância à polpa aumenta, há uma diminuição no número de túbulos dentinários, bem como o seu raio e a área ocupada pelos mesmos, sendo que para estes dois últimos os valores são aproximadamente 1,25  $\mu$  e 22%, respetivamente, perto da polpa, e 0,4  $\mu$  e 1%, respetivamente, na JAD. A área ocupada pela dentina peritubular também diminui, com valores registados à volta dos 60% na pré dentina e 2,9% perto da junção amelodentinária, enquanto a área ocupada pela dentina intertubular aumenta à medida que nos afastamos da polpa, com um aumento de 12% para 96% (Pashley, 1989). Todas estas características estruturais contribuem para a heterogeneidade da dentina. Como a dentina peritubular é muito mais dura do que a dentina intertubular, e a dureza dentinária está inversamente relacionada com a densidade tubular (Kinney et al., 1996), essa alteração pode contribuir para as diferenças gerais de dureza observadas na dentina.

Os cristais de apatite da dentina são muito menores (aproximadamente 5 x 30 x 100 nm) que aqueles encontrados no esmalte, apresentam menos quantidade de cálcio, consequência indireta da incorporação de flúor no cristal, e contêm cerca de 5% a 6% de carbonato (Marshall, 1993; Featherstone & Lussi, 2006). A presença de carbonatos e outras substituições iónicas perturba significativamente a estrutura cristalina da HA, tornando-a mais vulnerável suscetível a ataques ácidos e à solubilidade (Featherstone & Lussi, 2006).

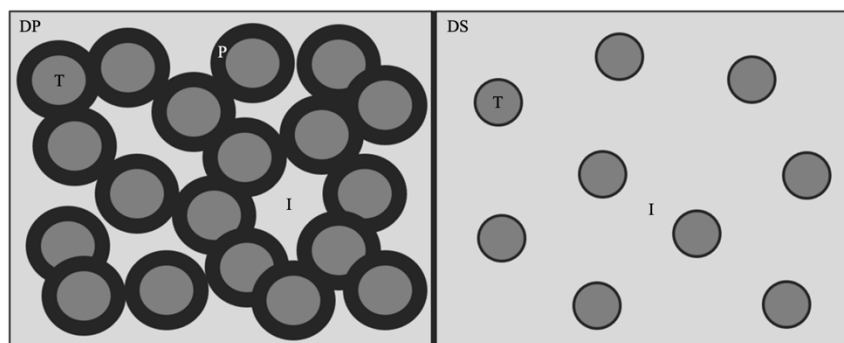


Figura 1. Ilustração da diferença no número de túbulos dentinários (T) e presença de dentina peritubular (P) e intertubular (I), entre dentina profunda (DP) e a dentina superficial (DS) coronárias (adaptado de Liwei et al., 2016).

Devido à estrutura tubular, a dentina é uma estrutura altamente permeável na qual pode ocorrer não apenas o fluxo de fluido dentinário para o exterior, mas também o movimento para o interior, por exemplo, de microrganismos (Tjäderhane et al., 2012). A permeabilidade da dentina é altamente variável e é dependente da localização no dente, sendo maior perto da polpa e dos cornos pulpares do que nas zonas adjacentes, derivado das características estruturais anteriormente descritas (Pashley et al., 1987). Ainda, o conteúdo de água é bastante mais elevado na dentina profunda (22% do volume) do que na dentina superficial (1% do volume) (Srinivasulu et al., 2012).

## 1.2. BIOMINERALIZAÇÃO

A dentina circumpulpar é responsável pela parte mais mineralizada da dentina e normalmente envolve secreção de colagénio tipo I juntamente com a participação de proteínas não colagénicas (NCPs) para regulação da mineralização (Sharma et al., 2021). A maioria dos moduladores de mineralização, incluindo proteínas colagénicas e não colagénicas, são secretados por odontoblastos, que também desempenham um papel fundamental no transporte de iões  $\text{Ca}^{2+}$  para a frente de mineralização (Goldberg et al., 1995). Na mineralização da dentina, o colagénio tipo I, a principal proteína da matriz, atua como um molde para a deposição mineral na presença de NCPs (como a proteína da matriz da dentina, DMP-1 e fosfoproteína da dentina, DPP) (Di Foggia et al., 2019).

Durante a dentinogénese, ocorrem geralmente três tipos de mineralização: mineralização guiada por vesículas derivadas da matriz celular (na dentina do manto) (Liwei et al., 2016), mineralização derivada das moléculas da matriz extracelular (na dentina intertubular) e mineralização derivada do soro sanguíneo (na dentina peritubular).

Embora diferenças substanciais sejam reconhecidas entre os três tipos de mineralização, existem algumas características comuns que permitem a proposição de um conceito geral sobre os mecanismos envolvidos (Goldberg, 2011).

### **1.2.1. COLAGÉNIO**

O colagénio tipo I é um heterotrímero, formado por duas cadeias  $\alpha 1$  e uma cadeia  $\alpha 2$ , com cerca de 1000 aminoácidos por cadeia, numa sequência repetida de glicina-X-Y, em que geralmente, X corresponde a prolina e Y a hidroxiprolina, permitindo assim, a formação de uma estrutura helicoidal com aproximadamente 300 nm de comprimento e 1,5 nm de largura (Landis et al., 2006; Henriksen & Karsdal, 2019; Martinez-Ortiz, 2014). O colagénio tipo I é constituído por um domínio central helicoidal e dois domínios terminais não helicoidais, N (N-propéptido) e C (C-propéptido), sendo que o domínio central corresponde a aproximadamente 95% da molécula na sua totalidade (Henriksen & Karsdal, 2019). Após a sua síntese no retículo endoplasmático, as três cadeias  $\alpha$  associam-se umas às outras em C-terminal e a tripla hélice forma-se na direção de N-terminal, formando assim o procolagénio (Yamauchi & Sricholpech, 2012). Durante este processo, as moléculas sofrem modificações pós-translacionais intracelulares como glicosilação e hidroxilação (Cui et al., 2007). Posteriormente, as moléculas de procolagénio são transportadas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e seguidamente para o espaço extracelular (Yamauchi & Sricholpech, 2012; Henriksen & Karsdal, 2019), onde são convertidas em tropocolagénio (figura 2), através da remoção dos propéptidos N e C pelas metaloproteinases, N-proteinase e C-proteinase, respetivamente (Abou Neel et al., 2016).

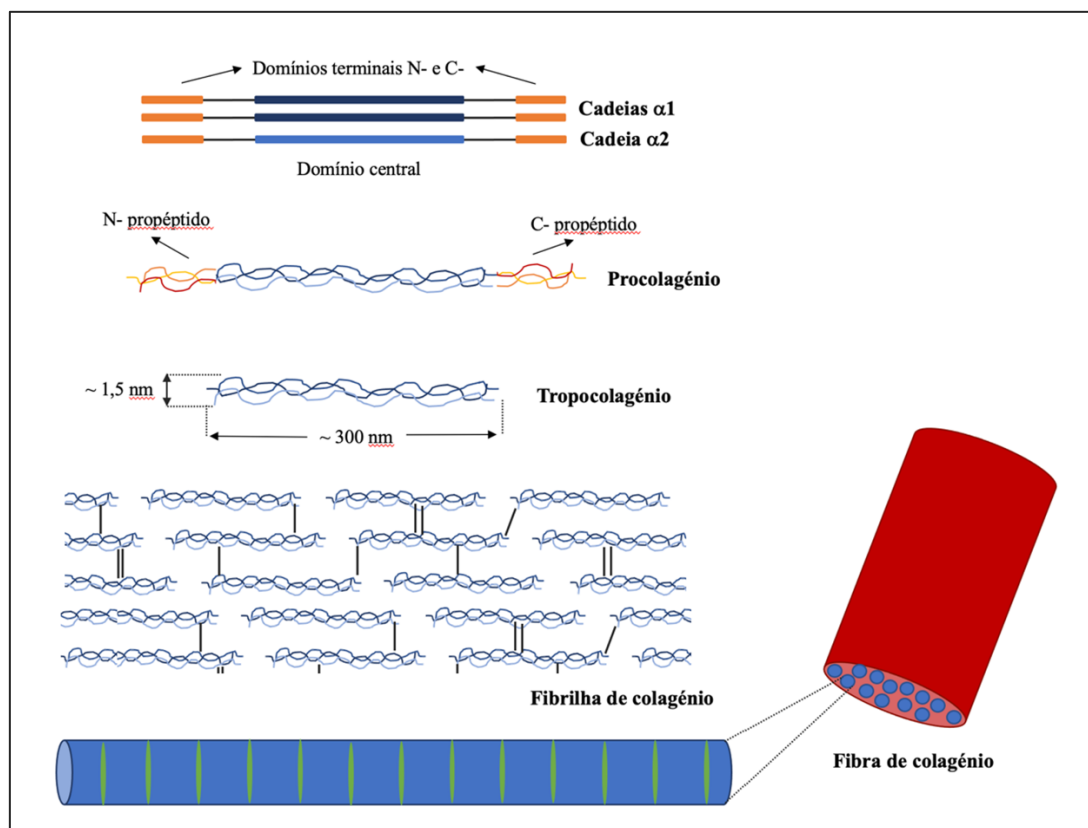


Figura 2. Ilustração esquemática da fibrilhogênese do colagénio (adaptado de Henriksen et al., 2019).

A estrutura tridimensional do colagénio foi primeiramente proposta por Petruska e Hodge, em 1964, num estudo de microscopia eletrónica. As suas observações levaram ao modelo de estrutura quaternária que, ao longo dos anos, foi refinado e em 2006, Orgel et al. descreveu com maior detalhe as microfibrilhas. O modelo mais amplamente aceite para descrever o emparelhamento das moléculas de colagénio consiste no alinhamento paralelo e longitudinal de cinco moléculas de tripla hélice, com uma distância de aproximadamente um quarto do comprimento molecular, para formar microfibrilhas (Cui et al., 2007). Assim, depois de ambos os propéptidos N e C serem clivados, as moléculas de colagénio são, então, espontaneamente emparelhadas em relação umas às outras com uma distância de repetição axial, chamada de período D ( $\sim 67$  nm). Este arranjo gera zonas repetidas de alta e baixa densidade, denominadas zonas de overlap (sobreposição), com cerca de 27 nm, e zonas de gap (buracos), com aproximadamente 40 nm, respetivamente, mostrando um padrão característico de uma fibrilha de colagénio (figura 3) vista ao nível ultraestrutural (Landis & Jacquet, 2013; Yaumachi & Sricholpech, 2012).

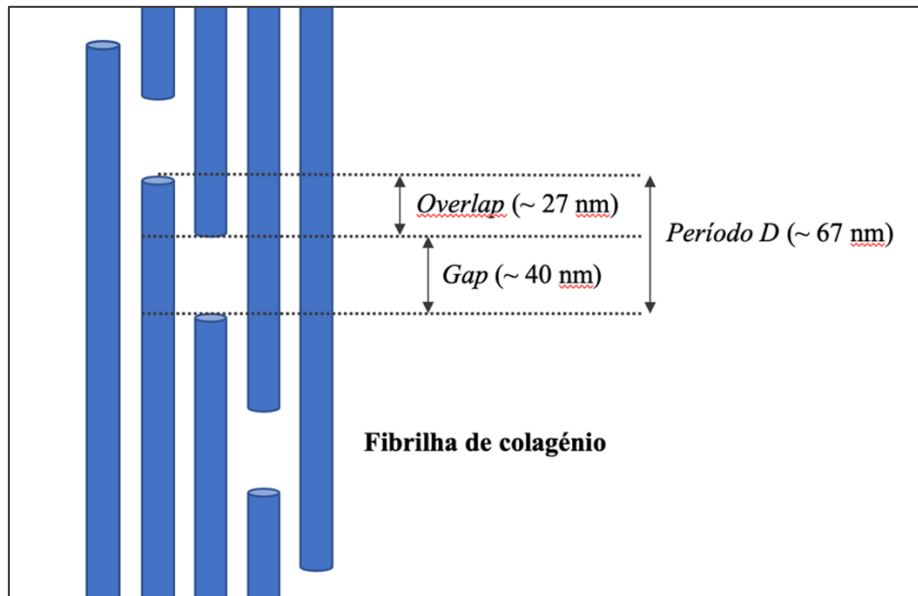


Figura 3. Ilustração dos buracos de colagénio (*gaps*) e das zonas de sobreposição (*overlaps*) (adaptado de Henriksen et al., 2019).

As moléculas de colagénio nas fibrilhas são tridimensionalmente estabilizadas por fracas interações dispersivas, ligações de hidrogénio, fortes ligações covalentes intermoleculares e ligações cruzadas que são críticas para a formação de fibrilhas de colagénio mecanicamente funcionais (Abou Neel et al., 2016; Yaumachi & Sricholpech, 2012). As fibrilhas podem reunir-se em fibras maiores e mais longas na ordem dos nanómetros a alguns micrómetros de diâmetro, servindo como principal esqueleto e estrutura de muitos tecidos (Zhu et al., 2018). A fibra final de colagénio pode ter de 20 a 400 nm de diâmetro e é estabilizada por quatro ligações covalentes de *crosslink* por cada molécula de colagénio, duas em cada ponta da molécula (Toroian et al., 2007). O alongamento longitudinal e a agregação lateral das fibrilhas de colagénio são responsáveis pelo aumento do seu diâmetro e migração em direção ao local onde sofrem mineralização, por exemplo, movimento das fibrilhas de colagénio da predentina proximal para a distal, onde ocorre a mineralização (Nanci, 2017).

Na dentina, o colagénio tipo I acomoda ~ 56% do mineral nos seus orifícios e poros de fibrilhas (Abou Neel et al., 2016). Vários estudos mostraram que a nucleação do mineral se dá preferencialmente dentro das regiões *gap* das fibrilhas de colagénio (Robinson & Watson, 1952; Traub et al., 1989), onde a maioria dos cristais são bem organizados em arranjos paralelos, em faixas escuras quase contínuas (Traub et al., 1989). É importante notar que, embora o mineral precipite preferencialmente nestas zonas, foi demonstrado que os cristais crescem em dimensão e, eventualmente, excedem o tamanho

da região de *gap* (Traub et al., 1989). Além disso, o mineral foi encontrado tanto dentro como fora das fibrilhas de colagénio, contudo, geralmente considera-se que a maioria do mineral existe no interior (Nudelman et al., 2013).

### **1.2.2. NUCLEAÇÃO E HIDROXIAPATITE**

O componente inorgânico dos tecidos biológicos duros designa-se hidroxiapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Esta fórmula indica apenas o conteúdo atómico de uma entidade conceptual chamada de célula unitária ou unidade estrutural, que tem o menor número de iões cálcio, fosfato e hidroxilo capazes de estabelecer relações estáveis (Nanci, 2017). Devido à presença de uma variedade de substituições e alterações dentro da apatite biológica, a sua relação cálcio-fosfato é diferente daquela da hidroxiapatite estequiométrica (HA, 1,67). A célula unitária da apatite biológica tem forma hexagonal e as várias repetições desta produzem cristais de vários tamanhos (Abou Neel et al., 2016; Nanci, 2017). Na dentina, os cristais são semelhantes a placas, com comprimento de 50 nm, largura de 20 nm e espessura de 2–5 nm (Vallet-Regi & González-Calbet, 2004).

Vários trabalhos sugeriram que a estereoquímica do polipeptídeo de colagénio tipo I e outros fatores são fundamentais nos eventos iniciais de deposição mineral nos espaços intrafibrilares da molécula (Silver & Landis, 2011; Wang et al., 2012). As matrizes extracelulares dos tecidos são banhadas por uma solução fluida supersaturada com iões cálcio e fosfato, que circulam dentro e fora das estruturas de colagénio (Silver & Landis, 2011). Acredita-se que as cadeias laterais dos aminoácidos carregados com polipeptídeos nas proximidades das zonas de *gap* e *overlap* do colagénio tipo I (Petruska & Hodge, 1964) contribuam com locais de ligação entre iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). A interação entre estes iões, na presença do colagénio, favorece a formação da célula unitária de hidroxiapatite (fenómeno designado por nucleação), bem como o seu subsequente crescimento e desenvolvimento em pequenos cristais em forma de plaquetas associados à proteína (Nanci, 2017). O colagénio tipo I, parece, então, atuar como um modelo para a nucleação do cristal, sem a necessidade de outras moléculas não colagénicas dos tecidos (Silver & Landis, 2011; Wang et al., 2012). Este mecanismo é válido para a mineralização de colagénio intrafibrilar, mas atualmente não se aplica à formação de mineral interfibrilar, entre fibrilhas, fibras de colagénio tipo I e outras formas hierárquicas estruturais adicionais de colagénio (Silver & Landis, 2011). Landis et al. (1996) mostraram por análise dos cristais intra e extrafibrilares, recorrendo a

difração de elétrons, diferenças estruturais compatíveis com fenômenos de mineralização distintos: a região intrafibrilar apresenta um mineral alinhado e altamente orientado em relação aos longos eixos de colagénio, enquanto a extrafibrilar é caracterizada por mineral com forma de anéis completos sem arcos, aparentemente gerados como consequência da orientação aleatória do mineral em relação ao colagénio (Landis et al., 1996; Nanci, 2017; Silver & Landis, 2011). Mais tarde, concluiu-se que os meios para a deposição mineral em torno do colagénio envolvem papéis e ações, em parte, de proteínas não colagénicas, como alguns membros da família SIBLING, e outras moléculas (Lausch et al., 2013).

A nucleação dos cristais e as alterações subsequentes no seu tamanho, forma, alinhamento e orientação que ocorrem com o seu crescimento e desenvolvimento parecem ser afetados por vários fatores, incluindo a estereoquímica específica das zonas de buracos e regiões de sobreposição de colagénio, bem como as características das ligações cruzadas entre as estruturas de colagénio (Landis et al., 1993; Landis & Silver, 2002; Landis et al., 2006). Ao longo dos anos vários estudos sugeriram e comprovaram a existência de uma fase amorfa, que existe além da fase de apatite cristalina como um precursor transiente (Termine & Posner, 1966; Eanes et al., 1965). Os resultados revelaram que durante a mineralização, os precipitados iniciais são amorfos — fosfato de cálcio amorfo (ACP) — e posteriormente se transformam primeiro em fosfato de octacálcio (OCP) e somente depois em hidroxiapatite (Eanes et al., 1965; Beniash et al., 2009; Mahamid et al., 2008, Mahamid et al., 2010; Mahamid et al., 2011).

Um estudo realizado por Cui et al. (2008), concluiu que a conformação do colagénio muda rapidamente durante a conversão amorfo/cristalina e amadurecimento do cristal. Os resultados mostraram as características de interação cooperativa entre o fosfato de cálcio e as moléculas de colagénio, ou seja, as moléculas de colagénio controlam a nucleação do fosfato de cálcio através do fornecimento de locais de nucleação, enquanto adotam diferentes conformações para adaptar a formação de biominerais.

### **1.2.3. PROTEÍNAS NÃO COLAGÉNICAS (NCPs)**

Acredita-se que as NCPs da matriz extracelular controlem vários aspetos da mineralização, especificamente por meio de mecanismos de inibição e promoção por fosfoproteínas e proteoglicanos (George & Veis, 2008). Para além disso, algumas dessas macromoléculas frequentemente contêm ácido aspártico, ácido glutâmico, serina e

treonina fosforiladas, de modo que se pensa que estejam envolvidas na deposição de minerais graças à sua alta afinidade por  $\text{Ca}^{2+}$  e colagénio (Di Foggia et al., 2019). Estes domínios ricos em ácido ou fosfoproteínas podem atuar como nucleadores, inibidores, moléculas de ancoragem, modificadores de crescimento ou como substratos para deposição de minerais (He et al., 2019).

Um grupo de proteínas que desempenha um papel importante na modulação da biomineralização da dentina é a família SIBLING (*small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein*), que inclui a osteopontina (OPN), proteína-1 da matriz dentinária (DMP-1), sialoproteína óssea (BSP), fosfoglicoproteína extracelular da matriz (MEPE), sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e os seus subdomínios, sialoproteína dentinária (DSP), glicoproteína dentinária (DGP) e fosfoproteína dentinária (DPP) (Sharma et al., 2020). A descoberta da DPP, por Veis e Perry (1967), foi a primeira evidência de fosfoproteínas envolvidas na mineralização. Verificaram que a DPP é particularmente rica em resíduos de serina, ácido aspártico e ácido glutâmico e levantaram, então, a hipótese de que esta proteína era capaz de nuclear a hidroxiapatite, quando ligada à superestrutura de colagénio no osso e na dentina. A DPP participa na mineralização intrafibrilar, na mineralização intertubular da dentina, na formação inicial dos cristais e na maturação dos mesmos (Gulseren et al., 2018). A DMP-1 está envolvida na regulação da nucleação e do crescimento e formação do cristal devido à sua capacidade de ligação ao cálcio e elevada afinidade com o colagénio (Gericke et al., 2010; Padovano et al., 2015). A BSP participa também na nucleação e deposição mineral (He et al., 2019).

No entanto, apesar das investigações providenciarem informação importante sobre o papel das proteínas colagénicas na precipitação da hidroxiapatite, não abrangem a complexidade total da interação entre o mineral, as proteínas da matriz extracelular e o colagénio (Nudelman et al., 2013). Foi demonstrado que a concentração da proteína e, se a mesma está livre ou imobilizada, pode afetar profundamente a sua função nos processos de mineralização (Lausch et al., 2013).

### **1.3. AGENTES DE RETICULAÇÃO**

As fibras de colagénio no tecido biológico são fortalecidas pela formação de ligações cruzadas nativas. As ligações cruzadas nativas dentro de uma molécula de tropocolagénio e entre diferentes moléculas são formadas entre resíduos de lisina e

hidroxilisina (Sung et al., 2003), localizados nos domínios telopeptídicos dos terminais amino e carboxilo da molécula, nos respetivos grupos carbonilo (Ritter et al., 2001).

Para estabilizar ainda mais as fibras de colagénio no tecido biológico, ligações cruzadas exógenas podem ser adicionadas à molécula de tropocolagénio entre as suas cadeias (ligações cruzadas intra-helicoidais) ou entre diferentes moléculas adjacentes (ligações cruzadas inter-helicoidais) com um agente de reticulação. As reticulações, ou ligações cruzadas, também podem ser formadas entre duas microfibrilhas adjacentes (reticulações intermicrofibrilhares), se a distância entre duas microfibrilhas (1,3–1,7 nm) for menor do que o comprimento do agente de reticulação introduzido (Zeeman et al., 1999).

Vários agentes de reticulação foram relatados, e a maioria deles ligam grupos amino de resíduos de lisina ou de hidroxilisina de diferentes cadeias polipeptídicas, por reticulação monomérica ou oligoméricas (Known, 2015).

### 1.3.1. GLUTARALDEÍDO

O glutaraldeído é um dialdeído com elevada afinidade pelos grupos primários de amina livres dos aminoácidos, sendo o agente mais conhecido da sua classe (Cheung et al., 1985). É um agente de reticulação sintético que tem sido vastamente utilizado como um fixador de tecidos biológicos, pois um aumento das propriedades mecânicas e menores taxas de degradação dos tecidos biológicos estão associados ao mesmo (Nimni et al., 1987; Sung et al., 1999a; Sung et al., 1999b). Apesar de todos os seus aspetos positivos, o GA é também conhecido pela sua citotoxicidade, que pode dever-se ao facto deste agente de reticulação sofrer despolimerização (Gendler et al., 1984), cujos resíduos resultantes, juntamente com as outras moléculas, o tornam bastante citotóxico (Hass et al., 2016). Os resultados obtidos num teste MTT (teste frequentemente utilizado para medir a citotoxicidade), realizado por Sung et al. (1999b), indicaram que a genipina é cerca de 10 000 vezes menos citotóxica que o glutaraldeído, o que a torna um agente de reticulação, possivelmente, mais biocompatível com os tecidos biológicos.

O glutaraldeído reage primeiramente com os grupos  $\epsilon$ -amina dos resíduos de lisina e hidroxilisina dos tecidos biológicos, através dos seus grupos funcionais aldeídos formando assim reticulações de base de *Schiff* redutíveis. Com a polimerização do glutaraldeído, subsequente à fixação, uma estrutura de ligações cruzadas intramoleculares

ou intermoleculares pode ser formada nas fibras de colagénio (Nimni et al., 1987; Ritter et al., 2001).

Um estudo revelou que o pré-tratamento com GA também pode fornecer locais de afinidade para a nucleação da hidroxiapatite no colagénio, possivelmente devido à introdução direta de grupos carbonilo, que podem induzir a mineralização do colagénio, sendo uma potencial estratégia para promover o processo de remineralização da dentina (Levy et al., 1986). Em 2001, Ritter et al. realizou uma experiência em dentes de bovino, na qual observou que o tratamento de dentina desmineralizada com o agente de reticulação glutaraldeído resultava na redução de resíduos livres de lisina e hidroxilisina em colagénio hidrolisado e num aumento de compostos redutíveis, o que provavelmente corresponderia à formação de novas ligações cruzadas.

Baixas concentrações de GA (cerca de 5%) já foram utilizadas como agente de reticulação de colagénio para aumentar a estabilidade da interface resina-dentina e melhorar a durabilidade da adesão (Al-Ammar et al., 2009; Bedran-Russo et al., 2008; Hass et al., 2016). No entanto, o seu efeito potencial na remineralização biomimética do colagénio dentinário requer mais estudos. Um dessensibilizador comercializado à base de GA — Gluma<sup>®</sup> — que contém 5,0% de GA, 35% de HEMA e 60% de água, foi testado em procedimentos restauradores. Concluiu-se que nas interfaces tratadas com Gluma<sup>®</sup>, houve inibição de MMPs de dentina humana endógena e uma melhora na estabilidade da adesão (Sabatini et al., 2014).

O pré-tratamento com GA tem sido aplicado para estabilizar o colagénio dentinário desmineralizado e melhorar as propriedades mecânicas por meio da formação de ligações cruzadas na dentina (Bedran-Russo et al., 2014). As redes de colagénio reticuladas podem preservar o colagénio ao inativar MMPs e catepsinas de cisteína. Porém, esta ligação cruzada artificial do colagénio não aumenta a rigidez molecular intrínseca do colagénio (Liao et al., 2005). O módulo de elasticidade do colagénio reticulado (cerca de 30 MPa) ainda é muito inferior ao colagénio infiltrado por resina (3–5 GPa) e ao colagénio mineralizado (20 GPa) (Liu et al., 2011; Chen et al., 2016). O colagénio livre de minerais é suscetível à fluência após o uso de longo prazo, e usar um agente de reticulação é, portanto, uma estratégia de curto prazo para preservar a estabilidade do colagénio (Fung et al., 2009).

Chen et al. (2016) estudaram as propriedades mecânicas e a bioestabilidade do colagénio da dentina, após a indução do processo de remineralização biomimética na

presença de glutaraldeído. Os resultados demonstraram a melhoria de algumas propriedades de dentina, como por exemplo, a microdureza.

### 1.3.2. GENIPINA

A genipina é um agente de reticulação bi-funcional e solúvel em água, que pode ser obtida a partir do seu composto original, geniposídeo, que é isolado dos frutos da *Gardenia jasminoides Ellis* (Mi et al., 2005; Muzarelli et al., 2009). A gardénia (*Gardenia jasminoides Ellis*) é uma planta que pode ser encontrada em países como a China e Tailândia e nos seus frutos está abundantemente presente geniposídeo, um glicosídeo iridóide, a partir do qual podemos preparar genipina (aglicona do geniposídeo) por hidrólise enzimática com recurso a uma  $\beta$ -glicosidase (Fujikawa et al., 1987a; Fujikawa, 1987b; Tsm et al., 1994). Até agora, os complexos resultantes das ligações cruzadas não são citotóxicos para os animais nem para as células humanas, sendo que a segurança e as ações benéficas da genipina emergem de uma série de projetos de pesquisa nas áreas de terapias de diabetes, periodontite, catarata, disfunção hepática, bem como na reparação de feridas e regeneração de nervos (Muzzarelli et al., 2009; Wang et al., 2012). Sabe-se que a GE reage espontaneamente com aminoácidos ou proteínas para formar pigmentos de cor azul escura (Fujikawa et al., 1987b), bastante utilizados como aditivos alimentares no este da Ásia (Yang et al., 2011).

Os mecanismos de reação deste composto com os tecidos biológicos não são ainda bem compreendidos. Fujikawa et al. (1987b) propuseram que a genipina reagia espontaneamente com um aminoácido para formar um iridóide nitrogenado, que sofria desidratação para formar um monómero aromático. Numa segunda fase, ocorria dimerização, possivelmente por uma reação radical. A GE pode reagir com grupos amino livres de lisina, hidroxilisina ou arginina para formar ligações cruzadas intra ou intermoleculares dentro de uma molécula de colagénio ou entre moléculas de colagénio adjacentes (Sung et al., 1999a; Sung et al., 2003). Adicionalmente, as ligações cruzadas intermicrofibrilares podem ser introduzidas entre as fibrilhas de colagénio via polimerização de moléculas de GE antes da reticulação (ligações cruzadas oligoméricas) (Sung et al., 2003; Mi et al., 2005).

#### **1.4. DESMINERALIZAÇÃO — REMINERALIZAÇÃO**

A desmineralização é o processo de remoção de íões minerais de cristais de HA de tecidos duros, como a dentina, enquanto a restauração destes mesmos íões minerais novamente para os cristais de HA é chamada de remineralização. Ambos os processos ocorrem na superfície do dente, e um número substancial de íões minerais pode ser perdido do HA sem destruir a sua integridade, mas será espectável sintomas como alta sensibilidade ao calor, frio, pressão e dor (Abou Neel et al., 2016). Os íões de cálcio, fosfato e flúor desempenham um papel importante na batalha entre os processos de desmineralização e remineralização e, conseqüentemente, modificam a suscetibilidade do dente à progressão da cárie (Hara & Zero, 2010).

A matriz colagénica pode ser degradada, mecanicamente ou bioquimicamente, devido a processos fisiológicos e patológicos (Cai et al., 2017), sendo a cárie dentária (processo de desmineralização) uma das principais causas (Hass et al., 2016). As lesões de cárie iniciais afetam a fase mineral da dentina e expõem as fibras de colagénio, criando condições favoráveis para uma rápida destruição de toda a rede dentinária, resultando na degradação das fibrilhas de colagénio e diminuição das propriedades mecânicas da dentina (Bertassoni et al., 2009). O processo de dissolução química dos componentes da matriz orgânica e inorgânica é facilitado pelo conteúdo de água presente na dentina, que facilita a difusão do ácido para o interior e do conteúdo mineral para o exterior do dente (Hara & Zero, 2010). A cárie dentinária consiste em duas camadas distintas: uma camada exterior de dentina infetada e uma camada mais interior de dentina afetada. A primeira é caracterizada como sendo altamente desmineralizada, fisiologicamente não remineralizável e possui fibrilhas de colagénio irreversivelmente desnaturadas com o desaparecimento virtual de ligações cruzadas. A segunda, por outro lado, apresenta-se parcialmente desmineralizada e fisiologicamente remineralizável, devendo por isso ser preservada no tratamento clínico (Nakajima et al., 2011; Di Foggia et al., 2019).

Assim, a remineralização dentinária é de grande relevância clínica na terapia das lesões de cárie e de hipersensibilidade dentárias. A remineralização da dentina desmineralizada é o processo de restauração de minerais por meio da formação de materiais inorgânicos semelhantes a minerais. A remineralização biomimética, uma metodologia que imita o processo natural de mineralização, que tem como abordagem o preenchimento do colagénio dentinário desmineralizado com partículas nano precursoras de ACP em solução. Esta estratégia de remineralização não depende de cristais residuais

remanescentes e pode ser considerada um método viável para remineralização de dentina desmineralizada (Cao et al., 2015).

### **1.5. MICRODUREZA DA DENTINA**

Os agentes de reticulação interagem com a matriz de colagénio da região extracelular, alterando a sua estabilidade, estrutura e rigidez (Bedran-Russo et al., 2007; Bedran-Russo et al., 2008). As propriedades mecânicas das fibras de colagénio, incluindo o módulo de elasticidade, dureza e resistência à tração, são geralmente avaliados antes e após o tratamento (Cai et al., 2017). Os testes de microdureza, juntamente com os modelos intra-orais, têm grande importância em experiências de desmineralização e remineralização (Gutiérrez-Salazar & Reyes-Gasga, 2003).

A dureza de dentes humanos pode ser avaliada através da dureza de Knoop ou Vickers, sendo que o valor médio dos testes é aproximadamente o mesmo (Ryge et al., 1961; Meredith et al., 1996). De acordo com a literatura os valores de dureza de Knoop para o esmalte e dentina estão compreendidos entre 272 e 440 KHN e entre 50 e 70 KHN, respetivamente (Meredith et al., 1996), e os de dureza de Vickers entre 270 e 360 VHN e entre 50 e 60 VHN para o esmalte e dentina, respetivamente (Gutiérrez-Salazar & Reyes-Gasga, 2003). Adicionalmente, Warkentin et al. (2018) descreveu valores de microdureza de Vickers para a dentina coronal compreendidos entre 20 e 90 VHN (Warkentin et al., 2018). Devido à maior dimensão da indentação, em relação à microestrutura da dentina, a variação dos valores de dureza relatados para a mesma pode ser devida às diferenças na densidade dos túbulos dentinários em diferentes zonas (Gutiérrez-Salazar & Reyes-Gasga, 2003). Um estudo feito por Kinney et al. (1996), utilizando um microscópio de força atómica modificado para medir a dureza da dentina a uma escala menor indicou que a dentina peritubular hidratada tem uma dureza dentro do intervalo de 2,2 a 2,5 GPa independentemente da localização, enquanto na dentina intertubular este valor depende da localização, e foi relativamente maior perto da junção amelocimentária (JAC) (0,49–0,52 GPa) do que perto da polpa (0,12–0,18 GPa).

### **1.6. PERTINÊNCIA DO ESTUDO**

A dentina profunda é considerada um grande desafio no campo da dentisteria restauradora, dado o seu alto conteúdo de água e presença de metaloproteinases que

condicionam o sucesso da técnica adesiva. Adicionalmente, a matriz de colagénio desmineralizada exhibe propriedades mecânicas muito mais fracas e pode ser facilmente degradada por metaloproteinases de matriz endógena derivada do hospedeiro (MMPs) e catepsinas de cisteína, que representam as barreiras críticas para o progresso futuro na adesão dentária (Liu et al., 2011; Tjäderhane et al., 2012). A estabilidade e integridade das fibrilhas de colagénio dentro da camada híbrida são cruciais para a durabilidade a longo prazo da adesão na dentisteria restauradora. Nesse sentido, a estabilização e o fortalecimento das fibrilhas de colagénio têm sido considerados como uma abordagem potencial para possivelmente restaurar a dentina danificada pela cárie dentária e melhorar a durabilidade da adesão (Cai et al., 2017).

A remineralização é uma estratégia de longo prazo para melhorar a durabilidade da adesão por meio da substituição progressiva da água e da imobilização de MMPs e catepsinas de cisteína. Os cristais de apatite intrafibrilares melhoram as propriedades mecânicas, e a fase mineral desempenha um forte papel protetor na inibição da degradação do colagénio (Chen et al., 2016). Na dentisteria restauradora atual, o uso de GA como agente de reticulação e o processo de remineralização são duas estratégias independentes para melhorar a durabilidade da adesão resina-dentina (Liu et al., 2011).

Tendo por base estudos anteriores e as características funcionais do GA e da GE, este trabalho experimental foi desenhado para combinar as duas estratégias anteriormente referidas — remineralização e aplicação de agentes de reticulação — com o objetivo de culminar num só procedimento os efeitos vantajosos que cada um destes tratamentos possui nas propriedades bioquímicas e mecânicas do colagénio dentinário.

## **1.7. OBJETIVOS**

Este trabalho experimental e analítico teve como principal objetivo avaliar o efeito dos agentes de reticulação, no processo de formação *ex vivo* de mineral em dentina profunda, a partir do desenvolvimento de um protocolo adequado, tendo por base os resultados obtidos em estudos precedentes, realizados no mesmo laboratório (Antunes, 2020; Araújo, 2019; Kakavas, 2020). Para tal, foram utilizados dois agentes de reticulação: o glutaraldeído e a genipina, um agente sintético e um natural, respetivamente. De modo a avaliar o efeito do tratamento nas propriedades mecânicas da dentina profunda, todos os espécimes foram sujeitos ao teste da microdureza de Vickers

e os respetivos resultados analisados estatisticamente, para comparar os mesmos entre grupos.



## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. COMISSÃO DE ÉTICA**

Após o parecer e aprovação da Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz, procedeu-se à recolha de dentes do Banco de Dentes da Clínica Universitária Egas Moniz, os quais foram doados por pacientes anónimos que assinaram um consentimento informado, autorizando a utilização dos mesmos para trabalhos de investigação científica.

### **2.2. GRUPOS DE ESTUDO**

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram considerados os seguintes grupos (tabela 1): grupo Dp0 (grupo de controlo) — dentina profunda sem qualquer tratamento; grupo Dp1 (grupo de controlo) — dentina profunda tratada com uma solução de ácido clorídrico (10 mM) durante 60 s; grupo Dp2 (grupo de controlo) — dentina profunda tratada com uma solução de ácido clorídrico (10 mM), posteriormente submersa numa solução de cloreto de cálcio (15,8 mM) em tampão de neutralização pH 7,4 contendo fosfatos (12,6 mM) durante 72 h a 21 °C; Dp3 — dentina profunda tratada primeiramente com uma solução de ácido clorídrico (10 mM) durante 60 s, seguidamente com uma solução de glutaraldeído a 5% durante 1 h a 37 °C e posteriormente submersa numa solução de cloreto de cálcio (15,8 mM) em tampão de neutralização pH 7,4 contendo fosfatos (12,6 mM) durante 72 h a 21 °C; grupo Dp4 — dentina profunda tratada com uma solução de ácido clorídrico (10 mM) durante 60 s, seguidamente com uma solução de genipina a 0,5% durante 1 h a 37 °C e posteriormente submersa numa solução de cloreto de cálcio (15,8 mM) em tampão de neutralização pH 7,4 contendo fosfatos (12,6 mM) durante 72 h a 21 °C. Para cada grupo, foram distribuídos, aleatoriamente, 10 fragmentos (amostras) obtidos através da secção de um total de 13 dentes, tendo cada um originado 4 fragmentos de dentina profunda.

Tabela 1. Grupos de estudo. Glutaraldeído (GA); genipina (GE); tampão de neutralização (TN).

Grupo Dp0 (n=10)	Amostra de dentina profunda sã (controlo negativo)
Grupo Dp1 (n=10)	Amostra de dentina profunda + HCl (10 mM); 60 s (controlo negativo)
Grupo Dp2 (n=10)	Amostra de dentina profunda + HCl (10 mM); 60 s + CaCl <sub>2</sub> (15,8 mM) em TN contendo fosfatos (12,6 mM); 72 h (controlo positivo)
Grupo Dp3 (n=10)	Amostra de dentina profunda + HCl (10 mM); 60 s + GA (5%); 1 h + CaCl <sub>2</sub> (15,8 mM) em TN contendo fosfatos (12,6 mM); 72 h
Grupo Dp4 (n=10)	Amostra de dentina profunda + HCl (10 mM; 60 s) + GE (0,5%); 1h + CaCl <sub>2</sub> (15,8 mM) em TN contendo fosfatos (12,6 mM); 72 h

### **2.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO**

De modo a obter o número de amostras necessárias para cada grupo experimental, foram selecionados 10 molares permanentes humanos hígidos, excluindo gérmes dentários. Para tal, os dentes foram analisados com recurso a lupa estereomicroscópica Leica TM MZ6 (Leica, Germany), tendo sido incluídos no estudo todos aqueles que se encontravam íntegros, livres de lesões de cárie ou fraturas, e que nunca tivessem sido submetidos a tratamentos químicos ou mecânicos, à exceção das técnicas e produtos de higienização oral do indivíduo.

### **2.4. DESINFEÇÃO E ARMAZENAMENTO**

Após a extração, logo que possível, foi feita a limpeza total das superfícies dentárias com água corrente e curetas Gracey, de modo a remover o sangue, possíveis restos de ligamento periodontal e cálculo dentário (ISO 29022:2013). Posteriormente, todos os dentes foram armazenados numa solução aquosa de cloramina T a 1% a 4°C sem exceder os 6 meses de armazenamento, evitando assim, alterações degenerativas nas proteínas dentinárias (ISO 29022:2013).

## 2.5. SECÇÃO DOS DENTES

Tendo em consideração os grupos experimentais, foi necessário um total de 13 dentes humanos permanentes hígidos que deram origem a 50 fragmentos, após a sua secção num micrómetro de tecidos duros Accutom50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca) (figura 4). Para tal, os dentes foram montados sobre um suporte acrílico com cera colante. Primeiramente foi excluído todo o esmalte superficial periférico através de dois cortes longitudinais no sentido vestibulo-lingual ou vestibulo-palatino de 3–5 mm, seguido de dois cortes longitudinais no sentido mesio-distal de 3–5 mm também. De seguida, foram feitos três cortes perpendiculares ao longo eixo do dente (transversais), descartando o fragmento oclusal (3–5 mm), o fragmento de dentina superficial (1,25 mm) e ainda o fragmento radicular, 2 mm acima da junção amelocimentária (Chen et al., 2016; Ramos et al., 2009), restando apenas o fragmento de dentina profunda com uma espessura de 1,25 mm. Cada um destes foi, finalmente, seccionado em 4 fragmentos de aproximadamente 3.0 x 4.0 mm de dimensão, perfazendo um total de 50 fragmentos de dentina profunda (figura 5). Por fim, os fragmentos foram polidos numa máquina circular de polimento (Struer TM, FEPA *paper*) com discos abrasivos de carbetto de silício de grão 500 e 800 (Fuentes et al., 2003), com o objetivo de remover qualquer possível irregularidade após os cortes (figura 6). De modo a identificar a superfície de estudo, a superfície oposta de cada fragmento (superfície mais próxima da câmara pulpar) foi identificada com uma marca de verniz, uma vez que este é dificilmente removido.

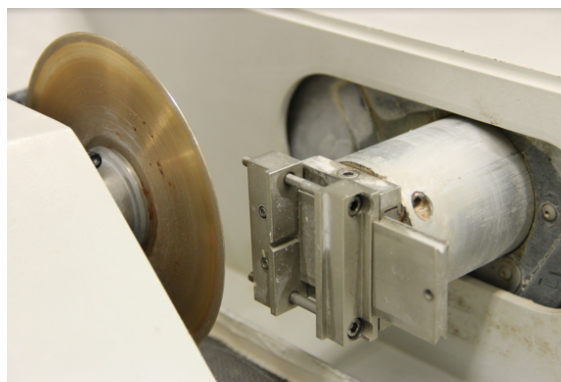


Figura 4. Micrómetro de tecidos duros Accutom50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca).

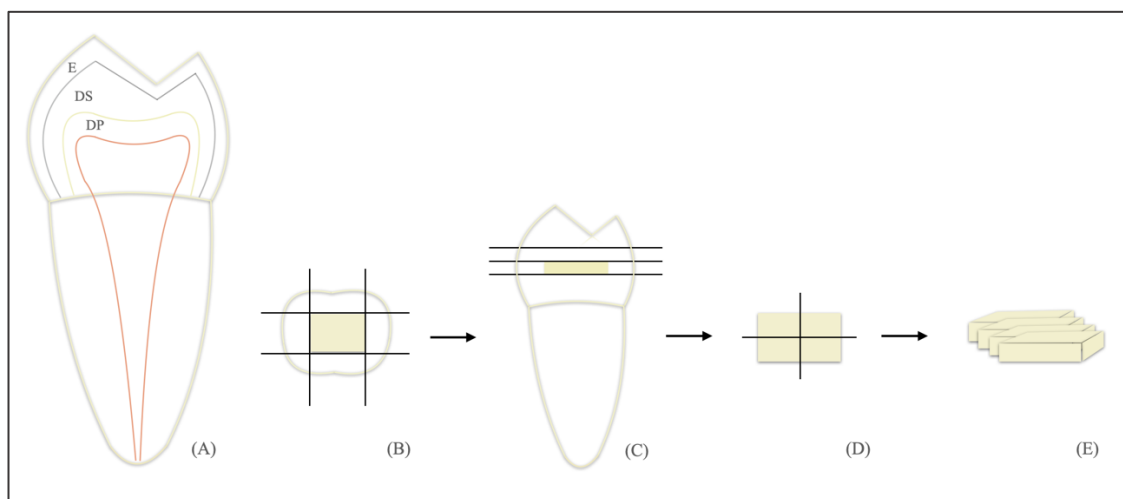


Figura 5. Representação esquemática do corte dos dentes; (A) constituição dentária: esmalte (E), dentina superficial (DS), dentina profunda (DP); (B) cortes longitudinais; (C) cortes transversais; (D) corte do fragmento de dentina profunda; (E) 4 espécimes de DP.

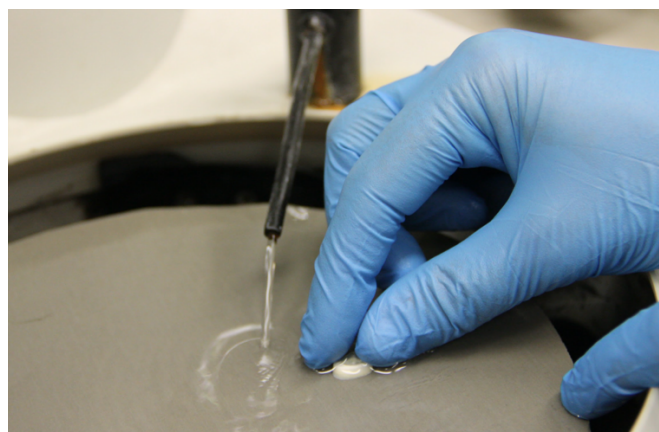


Figura 6. Máquina circular de polimento (Struer TM, FEPA paper) com disco abrasivo de carbeto de silício.

## 2.6. REAGENTES E PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

As tabelas 2 e 3 mostram a lista de reagentes e de soluções utilizadas no presente trabalho, respetivamente. As soluções foram preparadas uma única vez, em quantidade suficiente para a totalidade de ensaios necessários. À exceção da solução de ácido clorídrico, que foi sempre mantida a 4°C (Cui et al., 2008), todas as restantes soluções preparadas foram armazenadas à temperatura ambiente.

As soluções de cloreto de cálcio 0,1 M, cloreto de sódio 0,5 M, ácido clorídrico 1 M, 0,1 M e 10 mM, fosfato dissódico 0,1 M, fosfato monossódico 0,1 M e hidróxido de sódio 1 M, foram preparadas através da técnica de diluição com ddH<sub>2</sub>O (água bidestilada). A solução tampão de fosfatos de sódio foi obtida por junção das duas soluções iniciais de

fosfato dissódico 0,1 M e de fosfato monossódico 0,1 M. Para a obtenção da solução tampão Tris-HCl (0,2 M; pH 7,4), procedeu-se à técnica de diluição do reagente Tris(hidroximetil)aminometano, ao qual foi-se adicionando HCl até se obter um valor de pH neutro. Foi ainda preparada um tampão de neutralização de fosfato por adição das soluções tampão Tris-HCl, cloreto de sódio e tampão de fosfatos de sódio (Cui et al., 2008). Ambas as soluções tampão Tris-HCl e tampão de fosfatos de sódio foram ajustadas a pH 7,4, com recurso a um eletrodo de pH calibrado na gama de pH 4,01–0,01 com soluções tampão padrão. As concentrações referentes às soluções dos agentes de reticulação glutaraldeído 5% e genipina 0,5% tiveram como base estudos anteriores (Al-Amr et al., 2016), sendo que ambas as soluções foram obtidas através da diluição dos reagentes em ddH<sub>2</sub>O (Kakavas, 2020).

Tabela 2. Reagentes utilizados no estudo experimental.

Reagente	Fórmula química	Fornecedor	CAS number
Cloreto de cálcio	CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	10043-52-4
Cloreto de sódio	NaCl	Sigma-Aldrich	7647-14-5
Ácido clorídrico	HCl	Sigma-Aldrich	7647-01-0
Tris(hidroximetil)aminometano	(HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	77-86-1
Fosfato dissódico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	7558-79-4
Fosfato monossódico	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	7558-80-7
Glutaraldeído	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	111-30-8
Genipina	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	Fujifilm	-----

Tabela 3. Soluções preparadas para o estudo experimental.

Solução	MM/ Densidade	Volume preparado
Solução de cloreto de cálcio 0,1 M	110,98 g/mol	100 ml
Solução de cloreto de sódio 0,5 M	58,44 g/mol	100ml
Solução de ácido clorídrico 1 M	36,46 g/mol	50 ml
Solução de ácido clorídrico 0,1 M	-----	50 ml
Solução de ácido clorídrico 10 mM	-----	50 ml
Solução de fosfato dissódico 0,1 M	141,96 g/mol	100 ml
Solução de fosfato monossódico 0,1 M	137,99 g/mol	100 ml
Solução tampão fosfatos de sódio 0,1 M; pH 7,4	-----	250 ml
Solução tampão Tris-HCl 0,2 M; pH 7,4	121,14 g/mol	250 ml
Tampão de neutralização de fosfatos; pH 7,4	-----	190 ml
Solução de glutaraldeído 5%; pH 7,4	-----	20 ml
Solução de genipina 0,5%; pH 7,4	-----	20 ml

## 2.7. MÉTODO EXPERIMENTAL

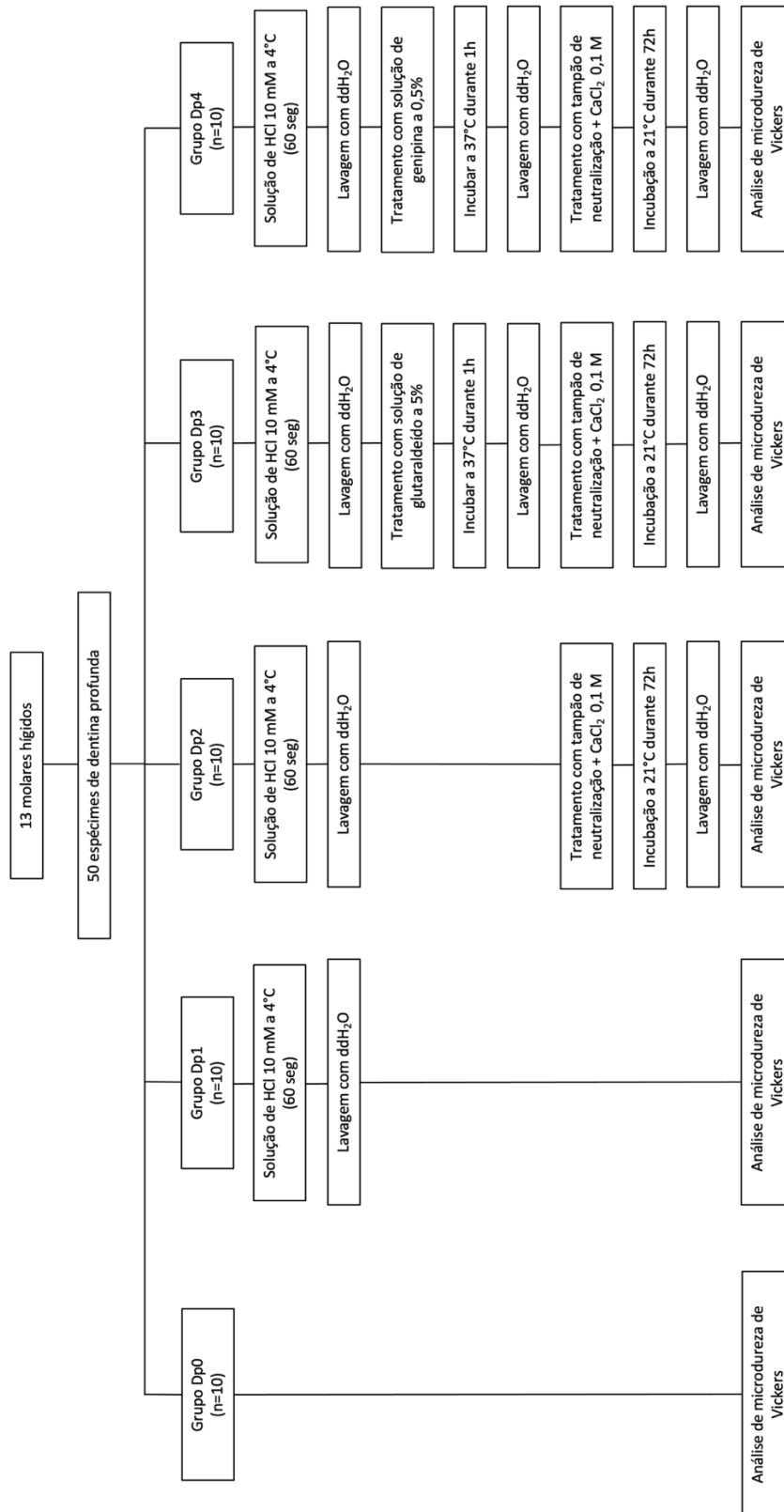


Figura 7. Diagrama ilustrativo do desenho de estudo.

### **2.7.1. GRUPO Dp0**

Após o polimento, todos os espécimes foram mantidos em água destilada, por um período não superior a 24 horas. O grupo Dp0 teve como objetivo servir de controlo negativo, correspondendo a amostras de dentina sã. Neste caso, os espécimes de dentina profunda não foram submetidos a qualquer tratamento, tendo sido apenas realizada a análise de microdureza de Vickers (figura 8).

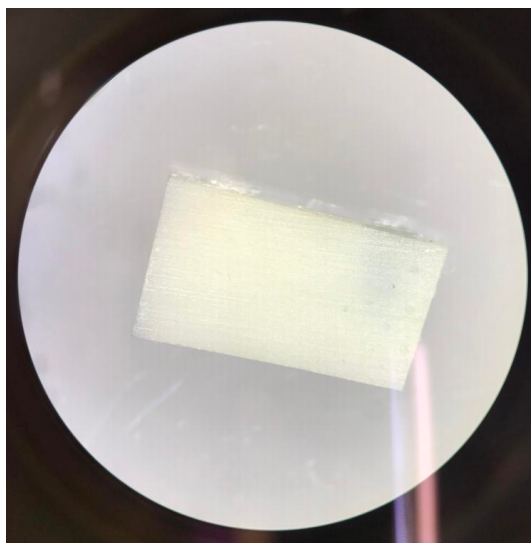


Figura 8. Imagem de dentina profunda sã, obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D.

### **2.7.2. GRUPO Dp1**

Com o grupo Dp1 pretendia-se controlar a variação da microdureza da dentina profunda com o tratamento com ácido (controlo negativo). O tratamento com solução ácida teve como objetivo provocar uma desorganização conformacional controlada e reversível das fibras de colagénio dentinário tipo I, de forma a induzir o rearranjo estrutural nativo e termodinamicamente mais estável da proteína, logo, a recuperação da componente biológica da matriz extracelular e, eventualmente, favorecer a remineralização. A concentração da solução ácida e o tempo do tratamento foram ajustados em trabalhos anteriores (Antunes, 2020; Araújo, 2019) de forma a prevenir a desmineralização da dentina. Os espécimes deste grupo foram imersos numa solução de ácido clorídrico 10 mM a 4°C (Cui et al., 2008) durante 60 s, após o que se procedeu à sua lavagem com ddH<sub>2</sub>O abundante durante 15s (Al-Ammar et al., 2009; Chen et al.,

2016), tendo-se removido o excesso de água por absorção. A dentina foi sempre mantida hidratada. Por fim, procedeu-se à análise da microdureza de Vickers (figura 9).

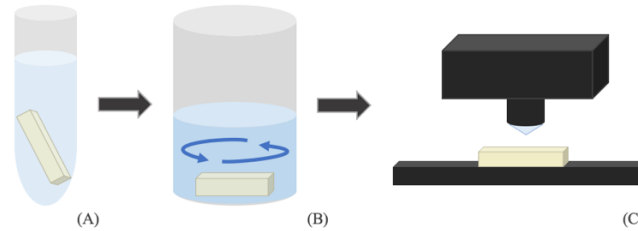


Figura 9. Representação esquemática do método experimental do grupo Dp1: (A) tratamento com solução de HCl, 60 s; (B) lavagem com ddH<sub>2</sub>O, 15 s; (C) teste de microdureza de Vickers.

### 2.7.3. GRUPO Dp2

O grupo Dp2 corresponde aos espécimes submetidos ao tratamento com solução ácida, seguido de indução de mineralização, sem adição de agente de reticulação. Este grupo corresponde ao controlo positivo, onde se esperava um aumento da microdureza. Para tal, os 10 espécimes foram primeiramente imersos numa solução de ácido clorídrico de 10 mM a 4°C durante de 60 s e seguidamente, lavados durante com ddH<sub>2</sub>O abundante durante 15 s (Al-Ammar et al., 2009; Chen et al., 2016). Após a remoção do excesso de água, cada espécime foi imerso numa solução contendo de cloreto de cálcio em tampão de neutralização contendo fosfatos, por um período de 72 h e com uma temperatura constante e ajustada a 21°C (Antunes, 2020; Cui et al., 2008; Kakavas, 2020). Os espécimes foram novamente lavados com água destilada e o excesso da mesma removido, previamente à análise da microdureza de Vickers (figura 10).

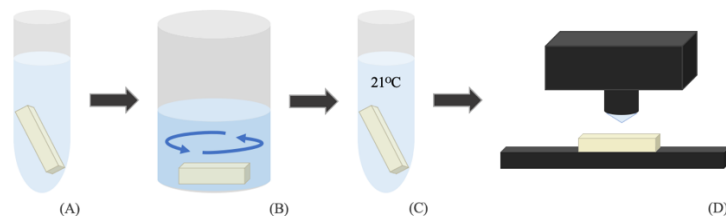


Figura 10. Representação esquemática do método experimental do grupo Dp2: (A) tratamento com solução de HCl, 60 s; (B) lavagem com ddH<sub>2</sub>O, 15 s; (C) tratamento com solução mineralizante, 72 h; (D) teste de microdureza de Vickers.

### 2.7.4. GRUPO Dp3

O grupo Dp3 corresponde a um grupo de estudo, no qual foi introduzido um passo de tratamento com agente de reticulação entre o tratamento com ácido e a mineralização. Os espécimes foram submetidos a um tratamento com uma solução de ácido clorídrico de 10 mM a 4°C, durante 60 s. Em seguida foram lavados com água bidestilada e tratados com uma solução de glutaraldeído a 5% durante uma hora (Al-Ammar et al., 2009), a uma temperatura de 37 °C. Posteriormente foram lavados com água destilada por 15 s e submetidos a um processo de remineralização através da sua imersão numa solução de cloreto de cálcio em tampão de neutralização contendo fosfatos, durante 72 h e a temperatura controlada de 21°C (Antunes, 2020; Cui et al., 2008; Kakavas, 2020). Por fim, procedeu-se ao teste de microdureza de Vickers (figura 11).

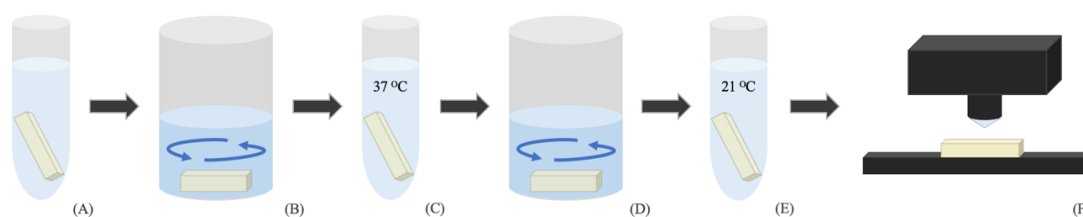


Figura 11. Representação esquemática do método experimental do grupo Dp3: (A) tratamento com solução de HCl, 60 s; (B) lavagem com ddH<sub>2</sub>O, 15 s; (C) tratamento com GA, 1 h; (D) lavagem com ddH<sub>2</sub>O; (E) tratamento com solução mineralizante, 72 h; (D) teste de microdureza de Vickers.

### 2.7.5. GRUPO Dp4

O grupo Dp4 corresponde a um segundo grupo de estudo, no qual foi utilizado um agente de reticulação diferente, a genipina. O procedimento experimental deste grupo foi idêntico ao do grupo Dp3, tendo-se realizado um tratamento com genipina 0,5% durante uma hora a 37°C após o tratamento com ácido e antes da indução da mineralização. Decorridas as 72 horas, procedeu-se à análise da microdureza de Vickers dos espécimes (figura 12).

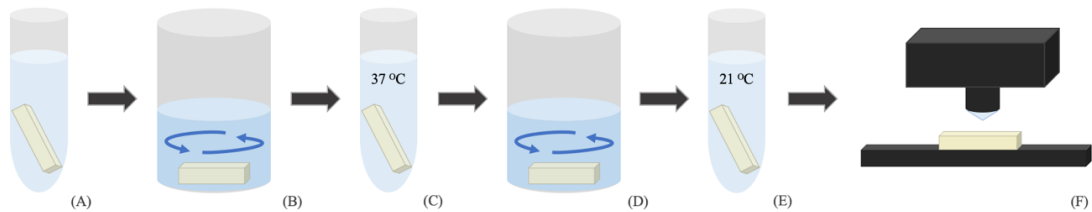


Figura 12. Representação esquemática do método experimental do grupo Dp4: (A) tratamento com solução de HCl, 60s; (B) lavagem com ddH<sub>2</sub>O, 15s; (C) tratamento com GE, 1h; (D) lavagem com ddH<sub>2</sub>O; (E) tratamento com solução mineralizante, 72h; (F) teste de microdureza de Vickers.

## 2.8. ANÁLISE DA MICRODUREZA DE VICKERS

Para a análise da microdureza de Vickers, neste trabalho, usou-se o aparelho Vickers Hardness Tester — HSV-30 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (figura 13). Um diamante, em forma de pirâmide com uma base quadrangular e ângulos específicos entre as faces opostas do vértice, é pressionado contra a superfície do material a testar, com uma força e intervalo de tempo previamente definidos, seguido da medição da largura da diagonal da indentação presente na superfície do material testado, após a remoção da força do teste (ISO 6507-1:2018).

Cada espécime de cada grupo foi submetido ao teste de microdureza de Vickers para avaliação da microdureza de superfície e posterior análise e comparação entre os resultados de cada grupo experimental. Para tal, um diamante em forma de pirâmide com uma base quadrangular e ângulos específicos entre as faces opostas do vértice, é pressionado contra a superfície do material a testar, com uma força e intervalo de tempo previamente definidos, seguido da medição da largura da diagonal da indentação presente na superfície do material testado (figura 14), após a remoção da força do teste (ISO 6507-1:2018). Foram realizadas cinco indentações por espécime, para calcular o seu valor médio, de modo a diminuir os erros aleatórios. Cada indentação foi espaçada por 100 micrómetros das adjacentes, tendo sido aplicada uma carga de 500 g, equivalente a 4,9 N, durante 10 s (Kandanuru et al., 2016).



Figura 13. Vickers Hardness Tester — HSV-30 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

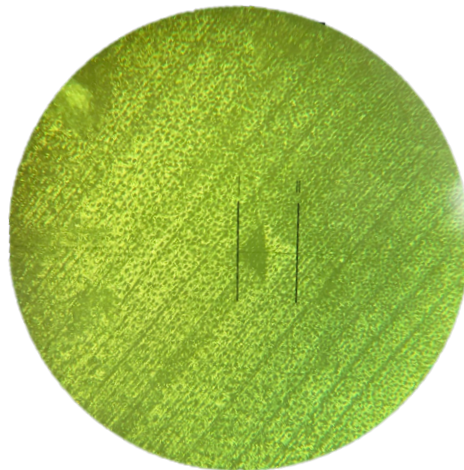


Figura 14. Exemplo de indentação em dentina profunda no teste de microdureza de Vickers, com visualização dos túbulos dentinários.

### 3. RESULTADOS

Findas as 72 horas de tratamento, removeram-se os fragmentos, descartando as soluções de cada microtubo, a partir das quais se fez o controlo de pH (figura 15), com recurso a tiras de pH, tendo sido registado em todos um pH neutro ( $\sim 7$ ). Nos grupos Gp2, Gp3 e Gp4, foi possível visualizar um aumento da turbidez (figura 16), bem como da viscosidade do meio.

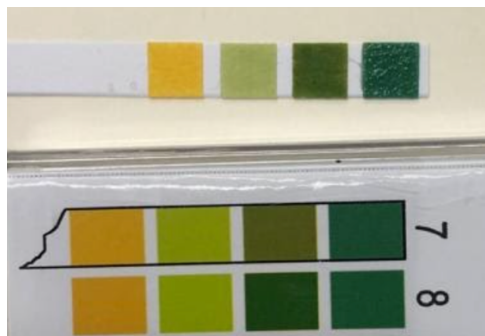


Figura 15. Controlo de pH às 72 horas.

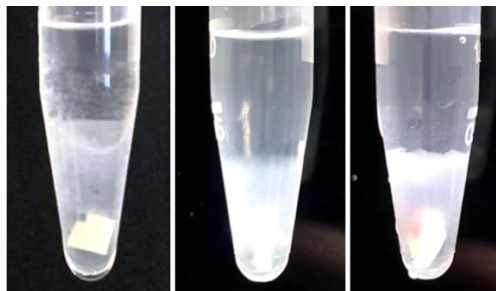


Figura 16. Aumento da turbidez da solução após a execução do passo de mineralização, às 72 h, nos grupos Dp2, Dp3 e Dp4 (da esquerda para a direita).

No grupo Dp4, que incluiu o tratamento dos espécimes com genipina como agente de reticulação, observou-se que após o passo de remineralização alguns fragmentos adquiriram uma coloração azul (figura 17). Contudo, esta alteração na coloração não foi visível em todos os fragmentos do grupo.

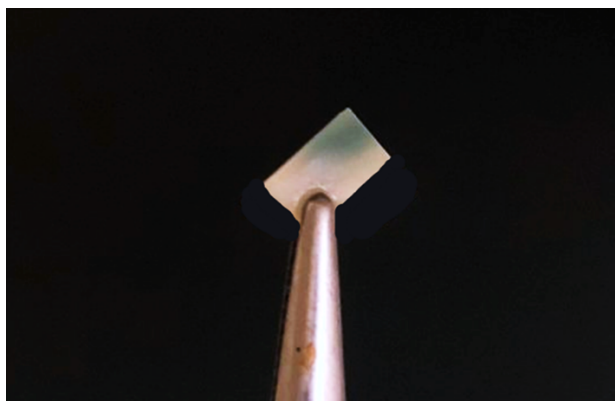


Figura 17. Formação de pigmento azul num espécime do grupo Dp4 após a execução do passo de mineralização, às 72 h.

Os resultados obtidos através da avaliação da microdureza de Vickers foram tratados estatisticamente recorrendo ao programa IBM® SPSS® Statistics versão 27.0.

A tabela 4 mostra a análise descritiva dos 5 grupos de estudo.

Tabela 4. Estatística descritiva dos grupos de estudo Dp0–Dp4 (*output* obtido recorrendo ao *software* de análise estatística SPSS).

<b>Descritivas</b>								
Microdureza								
	N	Média	Desvio padrão	Erro Padrão	95% de Intervalo de Confiança para Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Dp0	10	66.454	5.1520	1.6292	62.768	70.140	59.7	73.4
Dp1	10	61.918	6.8477	2.1654	57.019	66.817	51.6	73.4
Dp2	10	77.738	8.3527	2.6414	71.763	83.713	63.7	90.8
Dp3	10	76.496	8.7508	2.7672	70.236	82.756	60.4	89.6
Dp4	10	66.424	7.9850	2.5251	60.712	72.136	55.6	81.7
Total	50	69.806	9.5592	1.3519	67.089	72.523	51.6	90.8

O grupo Dp0, correspondente a dentina profunda sã, apresentou uma média de  $66,5 \pm 5,2$  HV. O grupo Dp1, correspondente a dentina profunda preparada com HCl, apresentou uma média de  $61,9 \pm 6,8$  HV. O grupo Dp2, correspondente a dentina profunda preparada com HCl e tratada com solução de cálcio e tampão de neutralização de fosfatos, apresentou uma média de  $77,7 \pm 8,4$  HV. O grupo Dp3, correspondente a dentina profunda preparada com HCl e tratada com GA, solução de cálcio e tampão de neutralização de fosfatos, apresentou uma média de  $76,5 \pm 8,8$  HV. Por fim, o grupo Dp4, correspondente a dentina profunda preparada com HCl e tratada com GE, solução de cálcio e tampão de neutralização de fosfatos, apresentou uma média de  $66,4 \pm 8,0$  HV.

Para determinar a existência de diferenças entre a microdureza dos grupos de estudo, aplicou-se o teste ANOVA a um fator (*one way ANOVA*), uma vez que era desejado comparar mais de dois grupos independentes e a única variável dependente (microdureza de Vickers) é do tipo quantitativo. Para um nível de confiança de 95%, verificou-se se estavam reunidos os requisitos necessários para a aplicação deste teste paramétrico, sendo eles a independência e normalidade das amostras e a homogeneidade das variâncias.

Independência das amostras: experimentalmente, pela aleatoriedade considerada na distribuição de fragmentos de dentina profunda pelos vários grupos, assim como pelo desenho do estudo considerado, garantiu-se que o resultado de cada grupo em nada condiciona os resultados dos restantes.

Normalidade das amostras: devido ao facto de a dimensão das amostras ser pequena ( $n=10$ ), foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk (tabela 5), cujos resultados demonstraram que todos os grupos são normais, ( $p>0,05$  em todos os grupos).

Tabela 5. Teste de normalidade — teste de Shapiro-Wilk (*output* obtido recorrendo ao *software* de análise estatística SPSS).

		<b>Testes de Normalidade</b>					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Grupos	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Microdureza	Dp0	.162	10	.200*	.906	10	.254
	Dp1	.116	10	.200*	.978	10	.951
	Dp2	.240	10	.107	.948	10	.648
	Dp3	.165	10	.200*	.975	10	.933
	Dp4	.234	10	.128	.910	10	.278

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Homogeneidade das amostras: A aplicação do teste de Levene (tabela 6) aos cinco grupos revelou que as variâncias não diferem significativamente ( $p>0,05$ ), ou seja, o teste confirmou a homogeneidade das variâncias pra um nível de confiança de 95%.

Tabela 6. Teste de homogeneidade de variâncias — teste de Levene (*output* obtido recorrendo ao *software* de análise estatística SPSS).

		Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
Microdureza	Com base em média	.617	4	45	.653
	Com base em mediana	.354	4	45	.840
	Com base em mediana e com gl ajustado	.354	4	37.696	.839
	Com base em média aparada	.580	4	45	.679

Verificadas as condições para a aplicação de um teste paramétrico, procedeu-se, então, à aplicação do teste ANOVA a um fator (tabela 7), definindo-se como hipótese nula ( $H_0$ ) a igualdade estatística entre as médias dos valores médios dos diferentes grupos de estudo e hipótese alternativa ( $H_A$ ) a existência de diferenças significativas entre as médias dos valores médios dos diferentes grupos.

Tabela 7. Teste ANOVA a um fator (*output* obtido recorrendo ao *software* de análise estatística SPSS).

Microdureza					
	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Entre Grupos	1,925.671	4	481.418	8.489	.000
Nos grupos	2,551.844	45	56.708		
Total	4,477.515	49			

O resultado obtido no teste ANOVA a um fator,  $F(4,45)=8,489$  revelou uma significância de 0,001 ( $p<0,05$ ), indicando existirem diferenças significativas na microdureza de Vickers entre grupos — verifica-se a hipótese alternativa. Estes resultados sugerem que pelo menos um dos valores médios é estatisticamente diferente dos restantes, pelo que foi necessário aplicar um segundo teste para a comparação múltipla de pares de grupos. Aplicou-se o teste de Bonferroni (tabela 8), sendo este o mais adequado para amostras homogêneas e de dimensão reduzida.

Tabela 8. Teste de Bonferroni para comparações múltiplas (*output* obtido recorrendo ao *software* de análise estatística SPSS).

**Comparações múltiplas**

Variável dependente: Microdureza  
Bonferroni

(I) Grupos	(J) Grupos	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Dp0	Dp1	4.5360	3.3677	1.000	-5.406	14.478
	Dp2	-11.2840*	3.3677	.016	-21.226	-1.342
	Dp3	-10.0420*	3.3677	.046	-19.984	-.100
	Dp4	.0300	3.3677	1.000	-9.912	9.972
Dp1	Dp0	-4.5360	3.3677	1.000	-14.478	5.406
	Dp2	-15.8200*	3.3677	.000	-25.762	-5.878
	Dp3	-14.5780*	3.3677	.001	-24.520	-4.636
	Dp4	-4.5060	3.3677	1.000	-14.448	5.436
Dp2	Dp0	11.2840*	3.3677	.016	1.342	21.226
	Dp1	15.8200*	3.3677	.000	5.878	25.762
	Dp3	1.2420	3.3677	1.000	-8.700	11.184
	Dp4	11.3140*	3.3677	.016	1.372	21.256
Dp3	Dp0	10.0420*	3.3677	.046	.100	19.984
	Dp1	14.5780*	3.3677	.001	4.636	24.520
	Dp2	-1.2420	3.3677	1.000	-11.184	8.700
	Dp4	10.0720*	3.3677	.045	.130	20.014
Dp4	Dp0	-.0300	3.3677	1.000	-9.972	9.912
	Dp1	4.5060	3.3677	1.000	-5.436	14.448
	Dp2	-11.3140*	3.3677	.016	-21.256	-1.372
	Dp3	-10.0720*	3.3677	.045	-20.014	-.130

\*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Este teste revelou que, para um nível de confiança de 95%, existem diferenças significativas entre os valores médios dos grupos de estudo (para todos os pares de grupos com  $p < 0,05$ ), visíveis na tabela 8. Na figura 18, é possível observar as diferenças dos valores médios de microdureza de Vickers entre os grupos de estudo de forma mais direta. Verifica-se que entre os grupos Dp0, Dp1 e Dp4 não existem, aparentemente, diferenças estatisticamente significativas. O mesmo acontece entre os grupos Dp2 e Dp3.

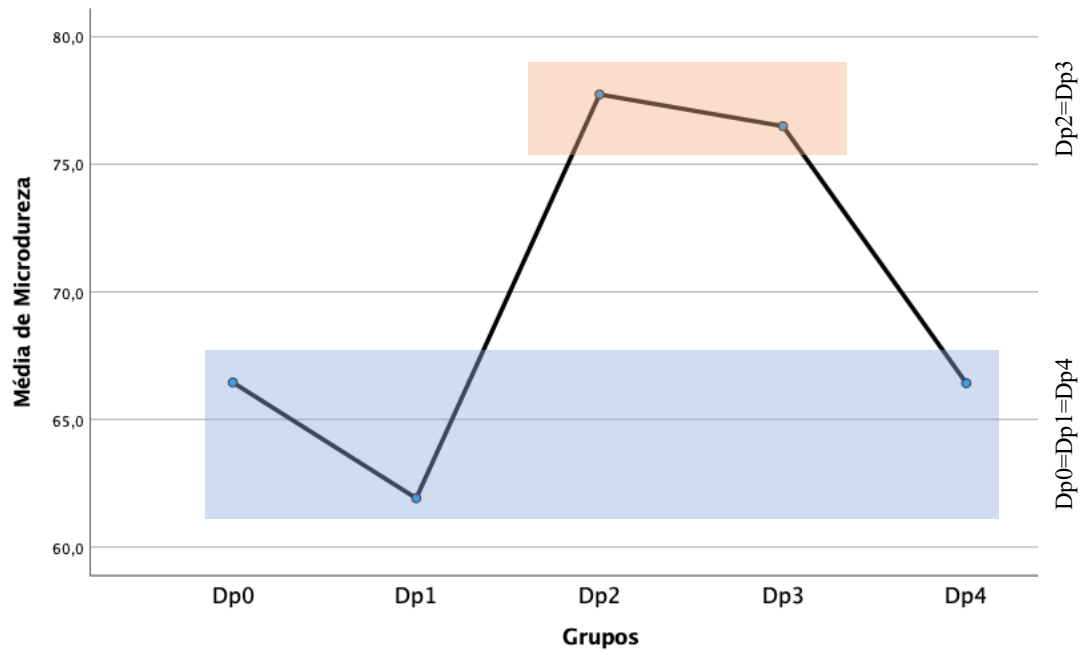


Figura 18. Gráfico da variação dos valores médios de microdureza (HV) obtidos para os vários grupos de dentina profunda (*output* da análise descritiva recorrendo ao *software* SPSS).

#### 4. DISCUSSÃO

O presente trabalho vem dar continuidade a uma série de estudos realizados no Instituto Universitário Egas Moniz, os quais otimizaram e estabeleceram algumas condições favoráveis ao processo de mineralização do colagénio *in vitro* (Antunes, 2020; Araújo, 2019; Kakavas, 2020). Um dos trabalhos experimentais, realizado recentemente por Kakavas (2020), estabeleceu algumas condições aparentemente favoráveis à formação de mineral *in vitro* na presença de agentes de reticulação, nomeadamente o GA e a GE, recorrendo à análise por microscopia eletrónica de varrimento (MEV) e por espectroscopia de Raios-X com dispersão de energia (EDS).

O presente estudo foi baseado num método experimental descrito por Cui et al. (2008), que promove simultaneamente o rearranjo conformacional (ou *self-assembly*) do colagénio e o início da mineralização *in vitro*, através da adição de uma solução de cloreto de cálcio e uma solução de neutralização de fosfatos, após a indução de um desarranjo reversível das moléculas de colagénio, através de uma solução ácida. Pequenas alterações foram feitas ao método acima descrito, de modo que o mesmo pudesse ser aplicado *ex vivo* na dentina profunda, tendo sido também combinado com um estudo realizado por Al-Ammar et al. (2009), o qual serviu como base relativamente às concentrações e protocolo de aplicação dos agentes de reticulação.

Alguns estudos demonstraram que a direção dos túbulos dentinários assume um papel importante durante a avaliação em testes mecânicos, uma vez que as fibras de colagénio estão orientadas perpendicularmente em relação aos túbulos. Os autores verificaram que a resistência à tração foi significativamente maior quando aplicada perpendicularmente aos túbulos dentinários do que quando paralelamente aos mesmos (Bedran-de-Castro et al., 2004; Miguez et al., 2004). Neste trabalho experimental, a força da indentação foi aplicada paralelamente ao eixo dos túbulos e, dado que todo o esmalte e dentina superficial foram removidos, era esperado que os valores médios de microdureza de Vickers obtidos para cada espécime não variassem muito dentro de um mesmo grupo, apesar de haver sempre ligeiras variações, uma vez que se trata de um tecido heterogéneo e que a indentação é maior em relação à microestrutura da dentina (figura 14). Assim, todas as superfícies de estudo apresentavam uma elevada densidade tubular, característica da dentina profunda, que se traduziu em valores de microdureza de Vickers próximos entre si para cada grupo e acordantes com os descritos na literatura para a dentina (20–90 HV) (Warkentin et al., 2018). O mesmo não aconteceria se a força da

indentação tivesse sido aplicada perpendicularmente ao eixo dos túbulos dentinários, pois os valores de microdureza de Vickers iriam diferir consoante a localização da indentação mais oclusal ou cervical, dado as diferenças na composição da dentina ao longo da extensão polpa–JAD (Pashley, 1989).

#### **4.1. GRUPO Dp1**

Após a análise estatística dos resultados obtidos da avaliação da microdureza de Vickers, podemos verificar que não houve diferenças significativas entre o grupo representativo da dentina profunda sã (Dp0) e o grupo de dentina tratada com HCl (Dp1), com valores de  $66,5 \pm 5,2$  HV e  $62,0 \pm 6,8$  HV, respetivamente. Este resultado era o esperado, uma vez que o tratamento com solução ácida teve como objetivo provocar uma desorganização conformacional controlada e reversível das fibras de colagénio dentinário tipo I. Este processo surge como consequência da acidificação do meio, que desfavorece as interações fracas que estabilizam as estruturas tridimensionais do colagénio. No entanto, o rápido restabelecimento do pH fisiológico favorece o *self-assembly* das moléculas de colagénio, ou seja, permite o rearranjo estrutural nativo e termodinamicamente mais estável da proteína, logo, a recuperação da componente biológica da matriz extracelular. Por sua vez, assume-se que a reorganização estrutural da matriz biológica favoreça a remineralização. Contudo, concentrações elevadas de ácido (ou pH muito baixo), podem provocar a desmineralização do conteúdo inorgânico dos tecidos biológicos duros e uma desnaturação irreversível das proteínas colagénicas, sendo o seu efeito dependente da concentração e do tempo de exposição. De acordo com os resultados obtidos e trabalhos anteriores (Antunes, 2020; Araújo, 2019), parece que o tratamento ácido, com a respetiva concentração e tempo de atuação utilizados, não provocou uma desmineralização, mas mostrou-se ser suficiente para induzir a desorganização conformacional das estruturas colagénicas de forma reversível e sem comprometer a matriz biológica.

#### **4.2. GRUPO Dp2**

Este grupo corresponde ao controlo positivo, onde se esperava um aumento da microdureza, e tal foi comprovado após a análise estatística. Os valores de microdureza

de Vickers para o grupo Dp2 ( $77,7 \pm 8,4$  HV) foram estatisticamente superiores aos valores obtidos para os grupos de controlo negativo Dp0 e Dp1 ( $66,5 \pm 5,2$  HV e  $61,9 \pm 6,8$  HV, respetivamente).

O efeito da acidificação prévia da dentina profunda com a solução de HCl na conformação do colagénio, foi revertida com a adição de uma solução de neutralização. Uma vez que a solução de neutralização utilizada para restabelecer o pH fisiológico continha fosfatos, e que uma solução de cloreto de cálcio foi precedentemente adicionada, era esperado que o rearranjo das fibrilhas de colagénio e o processo de remineralização ocorressem simultânea e sinergicamente, levando a um aumento da microdureza. Os resultados obtidos sugerem que ocorreu um processo de remineralização a partir da solução de cloreto de cálcio em solução de neutralização contendo fosfatos, que providenciou os iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  necessários para a formação de mineral na matriz biológica. A remineralização biomimética do colagénio dentinário pode ocorrer quando os cristais de apatite residuais ou núcleos de cristal estão presentes na matriz de colagénio, e os iões cálcio e fosfato são fornecidos pela solução mineralizante (Xu et al., 2010). Foram identificados locais específicos nas fibrilhas de colagénio, que têm o potencial de se ligar aos iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , iniciando assim a nucleação de apatite e mineralizando os tecidos de vertebrados (Nudelman et al., 2010). Foi demonstrado, que os grupos carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) são os principais locais de nucleação para as fibrilhas de colagénio e estão presentes em cerca de 11% dos resíduos de aminoácidos das moléculas de colagénio (Cui et al., 2007).

### 4.3. GRUPO Dp3

O grupo Dp3 teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento prévio com agente de reticulação GA na remineralização de dentina profunda. Verificou-se um aumento estatisticamente significativo na microdureza de Vickers deste grupo ( $76,5 \pm 8,8$  HV), comparativamente com os grupos de controlo Dp0 e Dp1 ( $66,5 \pm 5,2$  HV e  $61,9 \pm 6,8$  HV, respetivamente). Estes resultados sugerem ter havido indução do processo de remineralização, à semelhança do observado no grupo Dp2. No entanto, os valores médios de microdureza de Vickers deste grupo e os do grupo Dp2 ( $77,7 \pm 8,4$  HV) não diferem significativamente, o que aparenta sugerir que o GA não tenha favorecido a formação de mineral. Porém, diversos estudos mostram que o GA estabelece ligações covalentes com o colagénio (Hass et al., 2016; Perez-Puyana et al., 2016), e por essa

mesma razão a hipótese de o mesmo não ter tido qualquer interação com as estruturas colagénicas presentes na dentina profunda não faz sentido ser considerada. Como exposto anteriormente, a dentina profunda é constituída maioritariamente por túbulos dentinários delimitados por dentina peritubular, sendo menor a área de dentina intertubular comparativamente com a da dentina superficial e, conseqüentemente, também o conteúdo de colagénio. Assim sendo, os resultados obtidos no grupo Dp3 podem apenas refletir um efeito do pré-tratamento com GA na remineralização menos evidente quando comparado com o que seria espectável observar na dentina superficial. Ao contrário da dentina profunda, a dentina superficial é caracterizada pelo elevado conteúdo de fibrilhas de colagénio que constituem a dentina intertubular, sendo esta proteína o principal componente desta região. Existindo maior quantidade de moléculas de colagénio, com as quais o GA pode potencialmente reagir, o seu efeito será mais evidente na dentina superficial, refletindo-se num aumento significativo da microdureza. As ideias acima descritas vão ao encontro de vários estudos que comprovam a eficácia e eficiência do GA, no que concerne o aumento das propriedades mecânicas da dentina, após a sua reação com as moléculas de colagénio (Al-Ammar et al., 2009; Bedran-Russo et al., 2008). Adicionalmente, os resultados de um estudo realizado por Chen et al. (2016), indicaram que a formação de ligações cruzadas no colagénio dentinário, induzidas pelo GA, podem promover a remineralização biomimética da dentina, resultando em melhores propriedades mecânicas e bioestabilidade. Contudo, é de salientar que esse estudo não identifica o tipo de dentina usado, se foi superficial ou profunda.

Como se verificou anteriormente, o tratamento com ácido não originou uma diminuição do valor da microdureza, sugerindo não ter havido desmineralização significativa na dentina profunda em estudo, tal como se pretendia. Num estudo realizado por Chen et al. (2016), foi induzida uma desmineralização inicial do tecido biológico, mas tal não parece ter inibido ou comprometido o processo de remineralização dado os resultados apresentados, o que sugere que o tratamento ácido induziu um desarranjo conformacional das fibras de colagénio reversível. Encontrando-se as fibrilhas de colagénio protegidas pelo mineral na dentina intertubular, a desmineralização deste tecido poderá favorecer a difusão do GA e, conseqüentemente, o estabelecimento de ligações exógenas. Adicionalmente, o GA promove uma rápida formação de ligações cruzadas na superfície do tecido que cria uma barreira, impedindo a continuação da sua difusão até ao centro do tecido, comprometendo a sua ligação ao colagénio à medida que a profundidade aumenta (Cai et al., 2017; Hass et al., 2016). Assim, é possível que o mesmo tenha

também ocorrido para a dentina profunda, ou seja, a rápida formação de ligações cruzadas impediu a difusão do agente em profundidade no espécime, refletindo apenas a ocorrência de ligações cruzadas à superfície, o que provavelmente não promove locais de nucleação adicionais suficientes, de modo que após a remineralização haja alterações na microdureza de Vickers. Desta forma, embora o objetivo do tratamento ácido tenha sido apenas a desorganização reversível do material orgânico da dentina, é possível que se o mesmo tivesse originado uma desmineralização significativa, com diminuição evidente do valor médio de microdureza no grupo Dp3, o agente de reticulação difundisse mais, estabelecesse mais ligações cruzadas com o colagénio e originasse um aumento da microdureza mais expressivo.

Não obstante, de acordo com os resultados obtidos no grupo Dp3, o tratamento com GA, previamente ao processo de remineralização na dentina profunda, parece não apresentar vantagens. Dadas as características e condições próprias deste tecido, uma outra estratégia que retire benefício do elevado conteúdo mineral presente na dentina peritubular poderá ser explorada, de modo a melhorar as propriedades mecânicas da dentina profunda.

#### **4.4. GRUPO Dp4**

Tal como o grupo Dp3, este grupo teve como objetivo avaliar o efeito de um agente de reticulação no processo de remineralização de dentina profunda, a GE. A microdureza registada para este grupo ( $66,4 \pm 8,0$  HV) verificou-se ser significativamente idêntica à dos grupos de controlo negativo Dp0 e Dp1 ( $66,5 \pm 5,2$  HV e  $61,9 \pm 6,8$  HV, respetivamente) e inferior à do grupo de controlo positivo Dp2 ( $77,7 \pm 8,4$  HV). Tal não corresponde ao esperado, uma vez que era pretendido que a GE aumentasse a microdureza do tecido dentinário. Os resultados sugerem que para além do facto de a presença de GE não ter contribuído para a formação de minerais, parece ter também impedido, de certa forma, a formação dos mesmos no intervalo de tempo de 72 h.

Para além da questão do menor conteúdo de colagénio na dentina profunda, anteriormente descrita no grupo do GA e aplicando-se igualmente à GE, o não aumento da microdureza de Vickers neste grupo pode também ser justificado pelo facto de a genipina ter uma taxa de indução de ligações cruzadas mais lenta quando comparada com o glutaraldeído (Al-Ammar et al., 2009). É provável que uma hora de tratamento com GE não seja o suficiente para que a mesma induza ligações cruzadas exógenas suficientes e,

consequentemente, favoreça a remineralização. Um aumento das propriedades mecânicas da matriz dentinária, induzidas pela genipina, apenas está descrito após 40 horas de tratamento com a mesma (Bedran-Russo et al., 2006). Assim, será provável que uma hora de tratamento com genipina não seja o suficiente para favorecer a formação de cristais minerais, levando a um aumento da microdureza de Vickers. Por outro lado, o tratamento durante 40 horas não apresenta relevância clínica.

Ao contrário do esperado, os valores de microdureza obtidos no grupo Dp4, não só não foram superiores aos do grupo Dp2, como foram inferiores, sugerindo que a GE tenha inibido a formação de mineral. Se o tempo de atuação da GE tivesse sido superior, como anteriormente referido, seria possível que a taxa de indução de mineralização pudesse ser inferior à do GA, o que poderia ser favorável à mineralização. Uma vez que o processo de mineralização é altamente sensível e controlado, o prolongamento do processo de remineralização induzido pela GE poderá permitir que as NCPs envolvidas na mineralização possam atuar de forma mais intensiva. Como já referido, as NCPs podem atuar como nucleadores, inibidores, moléculas de ancoragem, modificadores de crescimento ou como substratos para deposição de minerais, garantindo que a velocidade da mineralização é favorável à evolução do ACP para OCP e finalmente para HA, e não para outras formas de apatite, as quais não são desejadas. Assim futuros estudos, poderiam testar diferentes tempos de tratamento tanto com a solução de GE, como a solução mineralizante após o tratamento com a GE.

Nalguns dos fragmentos de dentina profunda tratada com genipina, foi possível visualizar uma, alteração na coloração dos fragmentos, após as 72 h de remineralização, com a formação de um pigmento azul (figura 17). Esta pigmentação permite afirmar que, de facto, houve interação entre a genipina e as moléculas de colagénio dentinário. Na presença de oxigénio, a genipina pode sofrer, rapidamente, uma reação espontânea com aminas primárias presentes nos aminoácidos e proteínas, como o colagénio, formando pigmentos solúveis em água (Fujikawa et al., 1987a; Fujikawa et al., 1987b; Touyama et al., 1994a). Alguns autores sugeriram que estes pigmentos azuis são possivelmente formados por uma série de polimerização e desidrogenação, envolvendo radicais de oxigénio, de vários pigmentos intermediários utilizando o grupo  $\epsilon$ -amino de lisina e hidroxilisina (Touyama et al., 1994a; Touyama et al., 1994b). Contudo, o seu impacto na coloração da superfície dentinária tratada, apresenta limitações clínicas devido a questões estéticas. O facto de alguns espécimes não terem apresentado a alteração na sua coloração, pode ir de encontro a uma das limitações deste estudo mais à frente exposto.

Dada a variabilidade da dimensão coronal de cada dente, algumas superfícies de estudo poderiam estar mais próximas da superfície oclusal do que outras, aquando do seu corte, integrando já aquilo que é considerado dentina superficial. Essas mesmas superfícies teriam, então, maior conteúdo de dentina intertubular e, conseqüentemente, de fibrilhas de colagénio, proporcionando um maior número de ligações cruzadas. De acordo com a literatura, a intensidade da coloração azul do colagénio dentinário reflete a quantidade de ligações cruzadas formadas entre a GE e as moléculas de colagénios, sendo esta uma relação proporcional (Muzzarelli et al., 2015).

A GE pode apresentar várias formas consoante o pH do meio, sendo que para valores de pH extremos pode adquirir formas que impossibilitam a sua ligação às moléculas de colagénio. O valor de pH da solução de GE preparada neste trabalho experimental foi controlado e mantido neutro, promovendo assim formas de GE ligantes. Um estudo realizado por Mi et al. (2005), concluiu que as reações de *crosslinking* são dependentes do pH. Aquando condições neutras, a genipina reage primeiramente com os grupos amina (dos aminoácidos) para formar aminas heterocíclicas, que por sua vez associam-se para formar redes de ligações cruzadas constituídas por pequenas cadeias de pontes de dímeros, trímeros ou tetrâmeros (1~ 4 unidades de monómero). Por outro lado, em condições básicas, a genipina sofre abertura do anel e polimerização antes de se darem as ligações cruzadas. As pontes de ligações cruzadas consistem em macrómeros e oligómeros (7~ 88 unidades de monómeros) de genipina polimerizada (Mi et al., 2005). Desta forma, poderia ser vantajoso realizar o tratamento de GE, com a mesma diluída numa solução com pH básico de modo a induzir a sua polimerização e conseqüente obtenção de ligações cruzadas maiores, que talvez pudessem até estabelecer-se entre fibrilhas de colagénio.

Outras análises quantitativas e qualitativas deverão ser realizadas em estudos futuros para clarificar algumas questões e obter conclusões mais assertivas e coerentes relativamente à reação da GE com as moléculas de colagénio e o posterior processo de remineralização. As características exclusivas da dentina profunda, como a densidade tubular, dentina peritubular ou conteúdo colagénico, bem como as diferentes formas possíveis adquiridas pela GE, consoante as condições do meio, constituem assim um desafio.

#### **4.5. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

O presente estudo apresenta algumas limitações que podem comprometer e generalizar os resultados obtidos.

A utilização de dentes humanos implica sempre uma variabilidade das características das amostras, devido a questões genéticas específicas de cada indivíduo. Uma das características é a dimensão coronal de cada dente, que por sua vez influencia o espécime obtido devido à impossibilidade de excluir ou incluir de forma restrita o conteúdo desprezável ou de interesse, ou seja, num dente com uma coroa de maior dimensão, após a exclusão do esmalte periférico e os 2 cortes transversais de 1,25 mm, a superfície inferior do fragmento de dentina profunda poderia ainda estar uma distância considerável dos cornos pulpaes, enquanto um dente com uma coroa de menor dimensão, a mesma superfície poderia até atingir já os cornos pulpaes.

A dentina trata-se de um tecido altamente heterogêneo, e sendo o tamanho da indentação maior que a microestrutura da dentina, são espectáveis variações dos valores de dureza relatados para o mesmo espécime, constituindo um problema incontornável.

Uma outra limitação é o número de amostras (n=10), que poderia ser maior dada a heterogeneidade deste tecido, trazendo benefícios para o estudo.

A análise exclusiva da microdureza de Vickers, não permite aferir resultados conclusivos. Paralelamente uma outra análise deveria ser feita, como a microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS).

## 5. CONCLUSÃO

Mantendo presentes as condições seguidas pelo presente estudo, bem como todas as suas limitações anteriormente expostas, podemos tirar algumas conclusões como:

- 1) A presença de uma solução de remineralização, fornecedora de íões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , parece induzir a formação de apatite nas estruturas colagénicas da dentina profunda, levando a um aumento da microdureza de Vickers da mesma.
- 2) O agente de reticulação sintético glutaraldeído parece não ter efeito no processo de remineralização *ex vivo* da dentina profunda, não alterando, conseqüentemente, a microdureza de Vickers, comparativamente com o controlo positivo;
- 3) A presença do agente de reticulação natural genipina no processo de remineralização *ex vivo* da dentina profunda, parece desfavorecer a formação de apatite, diminuindo a microdureza de Vickers, comparativamente com o controlo positivo.
- 4) A literatura carece, ainda, de uma forte compreensão, não só do processo de mineralização da dentina, mas também das estruturas e componentes biológicos envolvidos na mesma. Parece também existir uma lacuna relativamente ao estudo das características da dentina profunda, o que por sua vez demonstra a importância da dedicação a trabalhos experimentais relacionados com a mesma. Dado os resultados obtidos, podemos concluir que a alta heterogeneidade e presença de variados componentes da dentina profunda tornam-na num tecido diferenciado da dentina superficial, com as suas próprias características biológicas e mecânicas, e tal deve ser tido em consideração aquando do seu estudo. É necessária uma melhor compreensão do comportamento tanto deste tecido biológico, como dos agentes de *crosslink*, podendo futuramente contribuir para a área de dentisteria restauradora, especialmente para a técnica adesiva.

## **5.1. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Estudos futuros deveriam incluir um maior número de amostras de modo a obter resultados mais fidedignos e o mesmo tipo de dente deveria ser utilizado, para evitar possíveis variações condicionantes dos resultados.

Uma análise qualitativa como por exemplo a microscopia de eletrónica de varrimento (SEM), poderia ser benéfica e útil para avaliar e controlar o efeito dos tratamentos realizados na estrutura dentinária.

A análise elementar por espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS) seria também importante, na medida em que seria possível entender a composição dos minerais formados.

Variações do pH da solução de genipina e diferentes tempos de tratamento devem ser testados, uma vez que na literatura estão descritos vários comportamentos da mesma consoante o nível de pH e que o seu tempo de atuação é mais longo.

Por fim, não podemos menosprezar o facto de o tempo de tratamento ser clinicamente irrelevante. Assim o tempo de pré-tratamento poderá ser reduzido ao aumentar as concentrações dos agentes de reticulação ou utilizando simultaneamente diversos agentes de reticulação para torná-lo clinicamente reprodutível.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization- remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/ijn.s107624>
- Al-Ammar, A., Drummond, J. L., & Bedran-Russo, A. K. (2009). The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *91B*(1), 419–424. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31417>
- Antunes, C. C. (2020). *Análise da mineralização dentário in vitro* [IUEM].
- Araújo, G. S. (2019). *Mineralização dentinária in vitro* [IUEM].
- Bedran-de-Castro, A. K. B., Pereira, P. N., & Thompson, J. Y. (2004). Influence of load cycling and tubule orientation on ultimate tensile strength of dentin. *Journal of Adhesive Dentistry*, *6*(3). [http://www.quintpub.com/userhome/jad/jad\\_6\\_3\\_castro\\_4.pdf](http://www.quintpub.com/userhome/jad/jad_6_3_castro_4.pdf)
- Bedran-Russo, A. K. B., Pashley, D. H., Agee, K., Drummond, J. L., & Miescke, K. J. (2008). Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *86B*(2), 330–334. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31022>
- Bedran-Russo, A. K. B., Pereira, P. N. R., Duarte, W. R., Drummond, J. L., & Yamauchi, M. (2006). Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *80B*(1), 268–272. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30593>
- Bedran-Russo, A. K., Pauli, G. F., Chen, S. N., McAlpine, J., Castellan, C. S., Phansalkar, R. S., Aguiar, T. R., Vidal, C. M., Napolitano, J. G., Nam, J. W., & Leme, A. A. (2014). Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dental Materials*, *30*(1), 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012>
- Beniash, E., Metzler, R. A., Lam, R. S., & Gilbert, P. (2009). Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel. *Journal of Structural Biology*, *166*(2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.02.001>

- Bertassoni, L., Habelitz, S., Kinney, J., Marshall, S., & Marshall Jr., G. (2009). Biomechanical Perspective on the Remineralization of Dentin. *Caries Research*, 43(1), 70–77. <https://doi.org/10.1159/000201593>
- Cai, J., Palamara, J. E. A., & Burrow, M. F. (2017). Effects of Collagen Crosslinkers on Dentine: A Literature Review. *Calcified Tissue International*, 102(3), 265–279. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0343-7>
- Cao, C., Mei, M., Li, Q. L., Lo, E., & Chu, C. (2015). Methods for Biomimetic Remineralization of Human Dentine: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4615–4627. <https://doi.org/10.3390/ijms16034615>
- Chen, C., Mao, C., Sun, J., Chen, Y., Wang, W., Pan, H., Tang, R., & Gu, X. (2016). Glutaraldehyde-induced remineralization improves the mechanical properties and biostability of dentin collagen. *Materials Science and Engineering: C*, 67, 657–665. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.076>
- Cheung, D. T., Perelman, N., Ko, E. C., & Nimni, M. E. (1985). Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues. *Connective Tissue Research*, 13(2), 109–115. <https://doi.org/10.3109/03008208509152389>
- Cui, F. Z., Li, Y., & Ge, J. (2007). Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 57(1–6), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.04.001>
- Cui, F. Z., Wang, Y., Cai, Q., & Zhang, W. (2008). Conformation change of collagen during the initial stage of biomineralization of calcium phosphate. *Journal of Materials Chemistry*, 18(32), 3835. <https://doi.org/10.1039/b805467c>
- di Foggia, M., Prati, C., Gandolfi, M. G., & Taddei, P. (2019). An in vitro study on dentin demineralization and remineralization: Collagen rearrangements and influence on the enucleated phase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 193, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.004>
- EANES, E. D., GILLESSEN, I. H., & POSNER, A. S. (1965). Intermediate States in the Precipitation of Hydroxyapatite. *Nature*, 208(5008), 365–367. <https://doi.org/10.1038/208365a0>
- Featherstone, J. D. B., & Lussi, A. (2006). Understanding the chemistry of dental erosion. *In Dental erosion*, 20, 66-76. <https://doi.org/10.1159/000093351>

- Fuentes, V., Toledano, M., Osorio, R., & Carvalho, R. M. (2003). Microhardness of superficial and deep sound human dentin. *Journal of Biomedical Materials Research*, *66A*(4), 850–853. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10064>
- Fujikawa, S., Fukui, Y., Koga, K., Iwashita, T., Komura, H., & Nomoto, K. (1987a). Structure of genipocyanin G1, a spontaneous reaction product between genipin and glycine. *Tetrahedron Letters*, *28*(40), 4699–4700. [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(00\)96601-2](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)96601-2)
- Fujikawa, S., Yokota, T., Koga, K., & Kumada, J. I. (1987b). The continuous hydrolysis of geniposide to genipin using immobilized  $\beta$ -glucosidase on calcium alginate gel. *Biotechnology Letters*, *9*(10), 697–702. <https://doi.org/10.1007/bf01024600>
- Fung, D. T., Wang, V. M., Laudier, D. M., Shine, J. H., Basta-Pljakic, J., Jepsen, K. J., Schaffler, M. B., & Flatow, E. L. (2009). Subrupture tendon fatigue damage. *Journal of Orthopaedic Research*, *27*(2), 264–273. <https://doi.org/10.1002/jor.20722>
- Gendler, E., Gendler, S., & Nimni, M. E. (1984). Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis. *Journal of Biomedical Materials Research*, *18*(7), 727–736. <https://doi.org/10.1002/jbm.820180703>
- George, A., & Veis, A. (2008). Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition. *Chemical Reviews*, *108*(11), 4670–4693. <https://doi.org/10.1021/cr0782729>
- Gericke, A., Qin, C., Sun, Y., Redfern, R., Redfern, D., Fujimoto, Y., Taleb, H., Butler, W., & Boskey, A. (2010). Different Forms of DMP1 Play Distinct Roles in Mineralization. *Journal of Dental Research*, *89*(4), 355–359. <https://doi.org/10.1177/0022034510363250>
- Goldberg, M. I. C. H. E. L., Septier, D., Lécolle, S. Y. L. V. I. E., Chardin, H., Quintana, M. A., Acevedo, A. C., ... & Thonemann, B. (1995). Dental mineralization. *The International journal of developmental biology*, *39*(1), 93–110. <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=7626424>
- Goldberg, M. (2011). Dentin structure composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, *E3*(2), 711–735. <https://doi.org/10.2741/e281>
- Gulseren, G., Tansik, G., Garifullin, R., Tekinay, A. B., & Guler, M. O. (2018). Dentin Phosphoprotein Mimetic Peptide Nanofibers Promote Biomineralization.

- Macromolecular Bioscience*, 19(1), 1800080.  
<https://doi.org/10.1002/mabi.201800080>
- Gutiérrez-Salazar, M. D. P., & Reyes-Gasga, J. (2003). Microhardness and chemical composition of human tooth. *Materials Research*, 6(3), 367–373.  
<https://doi.org/10.1590/s1516-14392003000300011>
- Hara, A. T., & Zero, D. T. (2010). The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 455–467.  
<https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.008>
- Hass, V., Luque-Martinez, I. V., Gutierrez, M. F., Moreira, C. G., Gotti, V. B., Feitosa, V. P., Koller, G., Otuki, M. F., Loguercio, A. D., & Reis, A. (2016). Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dental Materials*, 32(6), 732–741. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.03.008>
- He, L., Hao, Y., Zhen, L., Liu, H., Shao, M., Xu, X., Liang, K., Gao, Y., Yuan, H., Li, J., Li, J., Cheng, L., & van Loveren, C. (2019). Biomineralization of dentin. *Journal of Structural Biology*, 207(2), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.05.010>
- Henriksen, K., & Karsdal, M. A. (2016). Type I collagen. In *Biochemistry of collagens, laminins and elastin*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00001-5>
- ISO 29022:2013. *Dentistry – Adhesion – Notched-edge shear bond strength test*. (2013). Genebra, Suíça.
- ISO 6507-1:2018. *Metallic materials – Vickers hardness test – Part 1: Test method*. (2018). Genebra, Suíça.
- Kakavas, A. (2020). *Mineralização dentinária in vitro promovida por diferentes agentes de reticulação* [IUEM].
- Kandanuru, V., Madhusudhana, K., Ramachandrani, V., Vitta, H., & Babu, L. (2016). Comparative evaluation of microhardness of dentin treated with 4% titanium tetrafluoride and 1.23% acidic phosphate fluoride gel before and after exposure to acidic pH: An ex vivo study. *Journal of Conservative Dentistry*, 19(6), 560. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.194032>
- Kinney, J. H., Balooch, M., Marshall, S. J., Marshall, G. W., & Weihs, T. P. (1996). Atomic Force Microscope Measurements of the Hardness and Elasticity of Peritubular and Intertubular Human Dentin. *Journal of Biomechanical Engineering*, 118(1), 133–135. <https://doi.org/10.1115/1.2795939>

- Landis, W. J., Hodgens, K. J., Arena, J., Song, M. J., & McEwen, B. F. (1996). Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microscopy research and technique*, 33(2), 192-202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19960201\)33:2<192::AID-JEMT9>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19960201)33:2<192::AID-JEMT9>3.0.CO;2-V)
- Landis, W. J., & Jacquet, R. (2013). Association of Calcium and Phosphate Ions with Collagen in the Mineralization of Vertebrate Tissues. *Calcified Tissue International*, 93(4), 329–337. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9725-7>
- Landis, W. J., & Silver, F. H. (2002). The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(4), 1135–1157. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00248-9](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00248-9)
- Landis, W. J., Silver, F. H., & Freeman, J. W. (2006). Collagen as a scaffold for biomimetic mineralization of vertebrate tissues. *J. Mater. Chem.*, 16(16), 1495–1503. <https://doi.org/10.1039/b505706j>
- Landis, W., Song, M., Leith, A., McEwen, L., & McEwen, B. (1993). Mineral and Organic Matrix Interaction in Normally Calcifying Tendon Visualized in Three Dimensions by High-Voltage Electron Microscopic Tomography and Graphic Image Reconstruction. *Journal of Structural Biology*, 110(1), 39–54. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1993.1003>
- Lausch, A. J., Quan, B. D., Miklas, J. W., & Sone, E. D. (2013). Extracellular Matrix Control of Collagen Mineralization In Vitro. *Advanced Functional Materials*, 23(39), 4906–4912. <https://doi.org/10.1002/adfm.201203760>
- Levy, R. J., Schoen, F. J., Sherman, F. S., Nichols, J., Hawley, M. A., & Lund, S. A. (1986). Calcification of subcutaneously implanted type I collagen sponges. Effects of formaldehyde and glutaraldehyde pretreatments. *The American journal of pathology*, 122(1), 71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1888125/>
- Liao, J., Yang, L., Grashow, J., & Sacks, M. S. (2005). Molecular orientation of collagen in intact planar connective tissues under biaxial stretch. *Acta Biomaterialia*, 1(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2004.09.007>
- Linde, A. N. D. E. R. S., & Lundgren, T. (2003). From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *International Journal of Developmental Biology*, 39(1), 213-222.

- <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=7626409>
- Liu, Y., Tjäderhane, L., Breschi, L., Mazzoni, A., Li, N., Mao, J., Pashley, D., & Tay, F. (2011). Limitations in Bonding to Dentin and Experimental Strategies to Prevent Bond Degradation. *Journal of Dental Research*, 90(8), 953–968. <https://doi.org/10.1177/0022034510391799>
- Liwei, Z., Chenglin, W., & Ling, Y. (2016). Tooth development: embryology of the craniofacial tissues. *In Dental Caries*, 1-25. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-47450-1\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-47450-1_1)
- Mahamid, J., Aichmayer, B., Shimoni, E., Ziblat, R., Li, C., Siegel, S., Paris, O., Fratzl, P., Weiner, S., & Addadi, L. (2010). Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14), 6316–6321. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914218107>
- Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L., & Weiner, S. (2008). Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 12748–12753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803354105>
- Mahamid, J., Sharir, A., Gur, D., Zelzer, E., Addadi, L., & Weiner, S. (2011). Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study. *Journal of Structural Biology*, 174(3), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.03.014>
- Marshall Jr, G. W. (1993). Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence international*, 24(9). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8272499/>
- Martínez-Ortiz, M. A., Hernández-Fuentes, A. D., Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Vargas-Torres, A., & Aguirre-Álvarez, G. (2014). Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization. *CyTA - Journal of Food*, 13(2), 253–258. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.946451>
- Meredith, N., Sherriff, M., Setchell, D., & Swanson, S. (1996). Measurement of the microhardness and young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Archives of Oral Biology*, 41(6), 539–545. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(96\)00020-9](https://doi.org/10.1016/0003-9969(96)00020-9)
- Mi, F. L., Shyu, S. S., & Peng, C. K. (2005). Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between

- chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 43(10), 1985–2000. <https://doi.org/10.1002/pola.20669>
- Miguez, P., Pereira, P., Atsawasuwan, P., & Yamauchi, M. (2004). Collagen Cross-linking and Ultimate Tensile Strength in Dentin. *Journal of Dental Research*, 83(10), 807–810. <https://doi.org/10.1177/154405910408301014>
- Mjör, I., & Nordahl, I. (1996). The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Archives of Oral Biology*, 41(5), 401–412. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(96\)00008-8](https://doi.org/10.1016/0003-9969(96)00008-8)
- Muzzarelli, R. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>
- Muzzarelli, R., el Mehtedi, M., Bottegoni, C., Aquili, A., & Gigante, A. (2015). Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. *Marine Drugs*, 13(12), 7314–7338. <https://doi.org/10.3390/md13127068>
- Nakajima, M., Kunawarote, S., Prasansuttiporn, T., & Tagami, J. (2011). Bonding to caries-affected dentin. *Japanese Dental Science Review*, 47(2), 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2011.03.002>
- Nanci, A. (2017). *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function* (9th ed.). Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/ten-cates-oral-histology/nanci/978-0-323-48518-0>
- Nimni, M. E., Cheung, D., Strates, B., Kodama, M., & Sheikh, K. (1987). Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. *Journal of Biomedical Materials Research*, 21(6), 741–771. <https://doi.org/10.1002/jbm.820210606>
- Nudelman, F., Lausch, A. J., Sommerdijk, N. A., & Sone, E. D. (2013). In vitro models of collagen biomineralization. *Journal of Structural Biology*, 183(2), 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.04.003>
- Nudelman, F., Pieterse, K., George, A., Bomans, P. H. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., Hilbers, P. A. J., de With, G., & Sommerdijk, N. A. J. M. (2010). The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nature Materials*, 9(12), 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>

- Orgel, J. P. R. O., Irving, T. C., Miller, A., & Wess, T. J. (2006). Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9001–9005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502718103>
- Padovano, J., Ravindran, S., Snee, P., Ramachandran, A., Bedran-Russo, A., & George, A. (2015). DMP1-derived Peptides Promote Remineralization of Human Dentin. *Journal of Dental Research*, 94(4), 608–614. <https://doi.org/10.1177/0022034515572441>
- Pashley, D., Andringa, H., Derkson, G., Derkson, M., & Kalathoor, S. (1987). Regional variability in the permeability of human dentine. *Archives of Oral Biology*, 32(7), 519–523. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(87\)80014-6](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(87)80014-6)
- Pashley, D. H. (1989). Dentin: a dynamic substrate—a review. *Scanning microscopy*, 3(1), 19. <https://digitalcommons.usu.edu/microscopy/vol3/iss1/19/>
- Perez-Puyana, V., Romero, A., & Guerrero, A. (2016). Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(6), 1462–1468. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35671>
- Petruska, J. A., & Hodge, A. J. (1964). A subunit model for the tropocollagen macromolecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51(5), 871–876. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.871>
- Ramos, S. M. M., Alderete, L., & Farge, P. (2009). Dentinal tubules driven wetting of dentin: Cassie-Baxter modelling. *The European Physical Journal E*, 30(2). <https://doi.org/10.1140/epje/i2008-10444-x>
- Ritter, A. V., Swift, E. J., & Yamauchi, M. (2001). Effects of phosphoric acid and glutaraldehyde-HEMA on dentin collagen. *European Journal of Oral Sciences*, 109(5), 348–353. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2001.00088.x>
- Ryge, G., Foley, D. E., & Fairhurst, C. W. (1961). Micro-indentation hardness. *Journal of dental research*, 40(6), 1116–1126. <https://doi.org/10.1177/00220345610400060401>
- Robinson, R. A., & Watson, M. L. (1952). Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope. *The Anatomical Record*, 114(3), 383–409. <https://doi.org/10.1002/ar.1091140302>
- Sabatini, C., Scheffel, D. L., Scheffel, R. H., Agee, K. A., Rouch, K., Takahashi, M., Breschi, L., Mazzoni, A., Tjäderhane, L., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2014).

- Inhibition of endogenous human dentin MMPs by Gluma. *Dental Materials*, 30(7), 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.04.006>
- Sharma, V., Srinivasan, A., Nikolajeff, F., & Kumar, S. (2021). Biomineralization process in hard tissues: The interaction complexity within protein and inorganic counterparts. *Acta Biomaterialia*, 120, 20–37. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.049>
- Silver, F. H., & Landis, W. J. (2011). Deposition of apatite in mineralizing vertebrate extracellular matrices: A model of possible nucleation sites on type I collagen. *Connective Tissue Research*, 52(3), 242–254. <https://doi.org/10.3109/03008207.2010.551567>
- Srinivasulu, S., Vidhya, S., Sujatha, M., & Mahalaxmi, S. (2012). Shear Bond Strength of Composite to Deep Dentin After Treatment With Two Different Collagen Cross-linking Agents at Varying Time Intervals. *Operative Dentistry*, 37(5), 485–491. <https://doi.org/10.2341/11-232-1>
- Sung, H. W., Chang, W. H., Ma, C. Y., & Lee, M. H. (2003). Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research*, 64A(3), 427–438. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10346>
- Sung, H. W., Chang, Y., Chiu, C. T., Chen, C. N., & Liang, H. C. (1999). Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47(2), 116–126.
- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. L., & Tsai, C. C. (1999). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10(1), 63–78. <https://doi.org/10.1163/156856299x00289>
- Termine, J. D., & Posner, A. S. (1966). Infrared Analysis of Rat Bone: Age Dependency of Amorphous and Crystalline Mineral Fractions. *Science*, 153(3743), 1523–1525. <https://doi.org/10.1126/science.153.3743.1523>
- Tjäderhane, L., Carrilho, M. R., Breschi, L., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2009). Dentin basic structure and composition-an overview. *Endodontic Topics*, 20(1), 3–29. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00269.x>
- Tomoaia, G., & Pasca, R. D. (2015). On the Collagen Mineralization. A Review. *Medicine and Pharmacy Reports*, 88(1), 15–22. <https://doi.org/10.15386/cjmed-359>

- Toroian, D., Lim, J. E., & Price, P. A. (2007). The Size Exclusion Characteristics of Type I Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22437–22447. <https://doi.org/10.1074/jbc.m700591200>
- Touyama, R., Inoue, K., Takeda, Y., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Moritome, N., Shingu, T., Yokoi, T., & Inouye, H. (1994a). Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. II. On the Formation Mechanisms of Brownish-Red Intermediates Leading to the Blue Pigment Formation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(8), 1571–1578. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.1571>
- Touyama, R., Takeda, Y., Inoue, K., Kawamura, I., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Shingu, T., Yokoi, T., & Inouye, H. (1994b). Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. I. Structures of the Brownish-Red Pigments, Intermediates Leading to the Blue Pigments. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(3), 668–673. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.668>
- Traub, W., Arad, T., & Weiner, S. (1989). Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9822–9826. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9822>
- Tsm, T. H., Westly, J., Lee, T. F., & Chen, C. F. (1994). Identification and Determination of Geniposide, Genipin, Gardenoside, and Geniposidic Acid from Herbs by HPLC/Photodiode-Array Detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 17(10), 2199–2205. <https://doi.org/10.1080/10826079408013541>
- Veis, A., & Perry, A. (1967). The phosphoprotein of the dentin matrix. *Biochemistry*, 6(8), 2409–2416. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00860a017>
- Vallet-Regi, M., & González-Calbet, J. M (2004). Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry*, 32(1–2), 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2004.07.001>
- Wang, Y., Azais, T., Robin, M., Vallée, A., Catania, C., Legriel, P., Pehau-Arnaudet, G., Babonneau, F., Giraud-Guille, M. M., & Nassif, N. (2012). The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nature Materials*, 11(8), 724–733. <https://doi.org/10.1038/nmat3362>
- Warkentin, M., Freyse, C., Specht, O., Behrend, D., Maletz, R., Janda, R., & Ottl, P. (2018). Correlation of ultrasound microscopy and Vickers hardness measurements of human dentin and enamel — A pilot study. *Dental Materials*, 34(7), 1036–1040. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.020>

- Xu, Z., Neoh, K. G., & Kishen, A. (2010). A biomimetic strategy to form calcium phosphate crystals on type I collagen substrate. *Materials Science and Engineering: C*, 30(6), 822–826. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.03.014>
- Yamauchi, M., & Sricholpech, M. (2012). Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays in Biochemistry*, 52, 113–133. <https://doi.org/10.1042/bse0520113>
- Yang, D., Zhou, M., Wei, W., Zhu, H., & Fan, X. (2011). Preparation of a genipin blue from egg protein and genipin. *Natural Product Research*, 26(8), 765–769. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.547859>
- Zeeman, R., Dijkstra, P. J., van Wachem, P. B., van Luyn, M. J., Hendriks, M., Cahalan, P. T., & Feijen, J. (1999). Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials*, 20(10), 921–931. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00242-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00242-7)
- Zhu, S., Yuan, Q., Yin, T., You, J., Gu, Z., Xiong, S., & Hu, Y. (2018). Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(18), 2650–2676. <https://doi.org/10.1039/c7tb02999c>

