

Avaliação da Resistência de União Entre Resina Composta e Substrato Dentinário Exposto à Quitosana

Bond Strength Evaluation between Composite Resin and Dentin Exposed to Chitosan

Sarah Cavalcante de Barros^a; Heloíse Caroline Vieira^a; Maura Cristiane Gonçalves Orçati Dorilêo^b; Murilo Baena Lopes^{b*}; Sandrine Bittencourt Berger^b; Ricardo Danil Guiraldo^b; Alcides Gonini Júnior^b

^aUnopar, Curso de Odontologia.

^bUnopar, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia.

*E-mail: baenalopes@gmail.com

Resumo

Em endodontia, indicam-se substâncias quelantes para a remoção da lama dentinária. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, por meio do microcisalhamento, a resistência de união da resina composta com superfícies dentinárias tratadas com EDTA (17%) e quitosana (0,2%). De 30 coroas de dentes bovinos foram removidas as paredes palatina, mesial e distal, expondo a superfície dentinária da parede vestibular da câmara coronária, que abrasionada produziu a camada de esfregaço. Após, a superfície foi tratada, estabelecendo-se 3 grupos (n=10): G1 (controle) com aplicação de água destilada (1min); G2 com aplicação de EDTA (3 min.), e lavagem com água destilada (1 min.); e G3 com aplicação de quitosana (3 min.), lavagem com água destilada (1 min.). Na sequência foram aplicados 2 ml de NaOCl (2,5%), 2 ml de água destilada (1 min), armazenando-as em água destilada (37 °C). Retiradas da água destilada (24 h), fixaram-se 3 tubos Tygon (1mmX1mm) na dentina após o condicionamento local com sistema adesivo convencional de 2 passos. Preenchidos com resina composta e após fotoativação, os tubos foram removidos obtendo-se cilindros que foram submetidos ao microcisalhamento em máquina de ensaio universal. Os resultados de resistência de união (MPa) foram submetidos a Análise de Variância e Tukey, com nível de significância 5%. Observou-se que a resistência de união de G2 e G3 foram equivalentes estatisticamente ($p>0,05$), porém significativamente maiores que em G1 ($p<0,05$). Conclui-se que quitosana e EDTA promovem resistência de união semelhante nas condições testadas.

Palavras-chave: Camada de Esfregaço. Dentina. Endodontia.

Abstract

In endodontics, chelating substances are indicated for smear layer removal. This study evaluated, by micro-shear, the bond strength between composite resin and dentin surfaces treated with EDTA (17%) and chitosan (0.2%). The palatal, mesial and distal walls were removed from 30 crowns of bovine teeth, to expose buccal dentin of coronary chamber, whose abrasion produced the smear layer. The surface was treated, considering 3 groups (n = 10): G1 (control) distilled water (1min); G2 EDTA application (3 min), and distilled water (1 min); and G3 chitosan application (3 min.), distilled water (1 min.). All groups received 2 ml of NaOCl (2.5%), 2 ml of distilled water (1 min), and then stored in distilled water (37 °C). After that (24 h), 3 Tygon matrix (1 mmX1 mm) were fixed to the dentin after surface storing them with a two-step adhesive system. Then, the matrixes were filled with composite resin, and once photoactivated, the matrix were removed resulting in cylinders that were submitted to micro-shear bond test in universal test machine. The results (MPa) were submitted to ANOVA and Tukey, with significance level of 5%. It was observed that G2 and G3 bond strength were statistically equivalent ($p > 0.05$), but significantly higher than G1 ($p < 0.05$). It is concluded that chitosan and EDTA resulted in similar bond strength under the conditions tested.

Keywords: Smear Layer. Dentin. Endodontics.

1 Introdução

Tendo em vista a longevidade dos procedimentos restauradores realizados em dentes tratados endodonticamente¹, há a necessidade de se instituir um protocolo de procedimentos², ao considerar os processos de sanificação, modelagem e obturação tridimensional do sistema de canais radiculares³, prevendo-se a remoção da lama dentinária.

A lama dentinária, resultante da ação mecânica dos instrumentos sobre as paredes dentinárias, é constituída basicamente por restos de tecido pulpar vital ou necrosado, células sanguíneas, remanescentes de processos odontoblásticos, micro-organismos, e solução irrigadora, e por debris dentinários, compondo suas fases orgânica e inorgânica respectivamente⁴. Sua remoção facilita a ação da

medicação intra-canal e a adesão de cimentos obturadores às paredes dentinárias⁵, favorecendo a vedação marginal pós-obturação endodôntica⁶.

A remoção da lama dentinária pode ocorrer na fase de preparo químico-mecânico dos canais, por associação de soluções irrigantes, a base de hipoclorito de sódio com substâncias quelantes, como o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA); este último, atuando especificamente na remoção de componentes inorgânicos^{7,8}.

O EDTA, utilizado inicialmente com a finalidade de favorecer o preparo biomecânico de canais atresicos⁹, apresenta ação quelante ao promover a reação com íons cálcio da dentina, proporcionando descalcificação na estrutura dentinária em uma profundidade entre 20 a 30 μm , após 3 a 5 min de aplicação⁵. Em pH próximo de neutro¹⁰, o EDTA tem propriedade de fixar íons metálicos como os de cálcio,

promovendo sua quebra e facilitando a remoção da lama dentinária¹¹. É a substância mais utilizada na odontologia com esta finalidade, e é utilizada em larga escala na indústria, cujo uso tem sido questionado por não ser biodegradável^{7,12}. Por este aspecto negativo, substâncias alternativas para a remoção da lama dentinária têm sido propostas e estudadas¹³.

Uma delas é a quitosana, um polissacarídeo natural, abundante na natureza, ecologicamente correto, com propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesão e atoxicidade frente ao organismo humano. Tem a capacidade de desmineralizar o tecido dentinário de forma semelhante ao EDTA, proporcionando limpeza das paredes dentinárias por meio da remoção da lama dentinária, com ação equivalente dos ácidos cítrico e diaminotetracético, mas com a vantagem de ser utilizado em pequenas concentrações e por curto período de tempo¹⁴⁻¹⁷.

Entre as diversas aplicações, a quitosana tem sido utilizada em tratamentos distintos na odontologia, por inibir a formação de biofilmes¹⁸, pela capacidade de compor *scaffolds* de alta resistência¹⁹, por sua ação cicatrizante, anti-inflamatória e antimicrobiana^{18,20,21}.

No entanto, a relação de adesividade entre resinas compostas e o substrato dentinário exposto à quitosana ainda não está completamente esclarecido, em condições pós-tratamento endodôntico. Portanto, o objetivo deste estudo foi o de avaliar, *in vitro*, por meio do teste de microcisalhamento, a resistência de união da resina composta com superfícies dentinárias tratadas com substâncias quelantes, o EDTA a 17% e a quitosana a 0,2%.

2 Material e Métodos

Para a realização da presente pesquisa foram utilizadas trinta coroas de dentes incisivos inferiores bovinos, que foram devidamente congelados e armazenados até sua utilização, provenientes do projeto de tese realizado no Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Odontologia da UNOPAR, em que somente as porções radiculares foram utilizadas. O projeto em questão recebeu parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA sob o número 046/15. Antes do congelamento, os dentes passaram por limpeza com curetas periodontais, visando a remoção de tecido periodontal remanescente e cálculo, profilaxia com pedra pomes e água, seguido de armazenamento em solução de cloramina 0,05% (Farmácia Nossa Senhora de Fátima, Cuiabá, MT, Brasil) por sete dias.

Para a utilização efetiva das coroas, estas foram descongeladas em temperatura ambiente, armazenadas em potes de plástico com soro fisiológico e mantidas em estufa (37°C, 100% de umidade relativa) por 72h, para então receberem os procedimentos planejados. Foram utilizadas as coroas que não apresentavam defeitos estruturais clinicamente detectáveis.

De cada uma das coroas foi removido o esmalte e a dentina

palatina, mesial e distal com lixas de carbetto de silício 150 sob refrigeração, a fim de expor a superfície dentinária da parede vestibular da câmara coronária. Uma vez exposta, a superfície foi abrasionada por 60 segundos com lixas de carbetto de silício granulação 600 sob refrigeração, com a finalidade de padronizar a camada de esfregaço, ou lama dentinária.

Na sequência, os corpos de prova foram fixados em tubos plásticos com resina acrílica ativada quimicamente incolor, a fim de permitir o correto alinhamento e fixação dos mesmos durante o teste mecânico. A fixação ocorreu pela superfície vestibular em esmalte para que a superfície dentinária permanecesse livre e exposta.

Ao considerar o tratamento da superfície dentinária realizado após a criação da camada de lama dentinária, os corpos de prova foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=10), constituídos da seguinte maneira:

- Grupo 1 (controle): aplicação de água destilada por 1min;
- Grupo 2: aplicação de EDTA 17%, mantido inerte por 3 minutos, seguido de lavagem com água destilada por 1 minuto e;
- Grupo 3: aplicação de quitosana 0,2%, mantida inerte por 3 minutos, seguida de lavagem com água destilada por 1 minuto.

Após os tempos previstos, as superfícies de dentina foram irrigadas sequencialmente com 2 ml de NaOCl a 2,5%, 2 ml de água destilada e deionizada por 1 min, e armazenadas em recipiente com água destilada em estufa a 37 °C.

As soluções de EDTA trissódico a 17% e de quitosana a 0,2%, foram formuladas em farmácia de manipulação (Farmácia Hygia, Cuiabá, MT, Brasil), preparadas com reagentes de grau analítico, e água purificada por um sistema de osmose reversa com luz ultravioleta (Quimis, Diadema, SP, Brasil) com condutividade elétrica inferior a 1 µS.

Para a realização do teste de microcisalhamento, os corpos de prova foram retirados da água destilada, e seu excesso foi removido com discos de papel absorvente. Para a avaliação da resistência de união, foram considerados três pontos de referência em cada superfície de dentina. O primeiro localizado no centro da superfície, e os outros dois a 3mm destes, sendo um superior e outro inferior, dispostos no sentido longitudinal do corpo de prova.

Em cada local foram aplicados ácido fosfórico à 37% (Ultradent products) por 15 segundos, seguido de lavagem com água destilada, remoção do excesso de umidade, e aplicação do adesivo Adper Single Bond (3M ESPE). Antes da fotoativação da camada de adesivo foram posicionados tubos de polietileno (Tygon) de 1mm de diâmetro por 1mm de altura, que permaneceram fixados na posição. Por meio de uma sonda exploradora, os tubos foram preenchidos com resina composta (Filtek Z350, 3M ESPE), a qual foi fotoativada por 20 segundos. Na sequência, os tubos foram seccionados longitudinalmente, e uma vez removidos, resultaram em três cilindros de resina composta.

Após armazenamento em água destilada a 37°C por 24h,

os tubos plásticos com os corpos de prova foram levados ao dispositivo próprio para o teste de microcisalhamento na máquina de ensaio universal. Uma vez alinhados verticalmente, um a um os cilindros de resina composta foram envolvidos por fio de aço (0,010 polegadas de diâmetro) na união resina/substrato, e carregados na velocidade de 1 mm/min até a ocorrência de falha. Os valores resultantes (MPa) sofreram análise estatística, por meio da Análise de Variância e Tukey, com nível de significância de 5%.

3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos a partir da análise estatística estão apresentados no Quadro 1 e Figura 1. Observa-se que os valores (MPa) de resistência de união dos grupos EDTA e quitosana são equivalentes estatisticamente entre si ($p > 0,05$), porém significativamente maiores que os do grupo controle ($p < 0,05$).

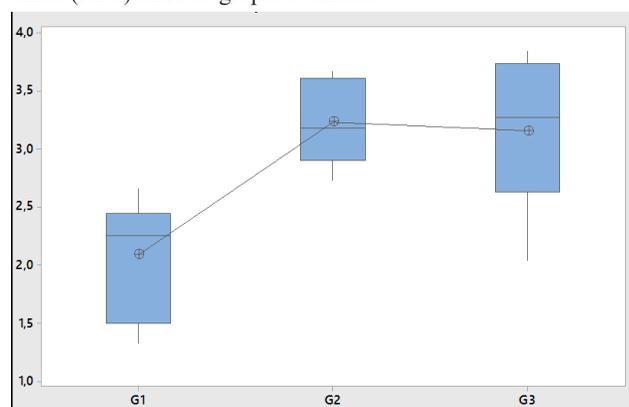
Quadro 1 – Valores de resistência de união (MPa) e desvio padrão por grupo

Grupo	Média	Desvio Padrão
Controle (G1)	2,09 a	± 0,50
EDTA (G2)	3,24 b	± 0,36
Quitosana (G3)	3,16 b	± 0,62

* letras distintas demonstram diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$)

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 1 – Diagrama de distribuição dos valores de resistência de união (MPa) entre os grupos avaliados



Fonte: Dados da pesquisa

A lama dentinária depositada sobre as paredes dentinárias, na maior parte das vezes é resultante da execução do preparo cavitário na dentística restauradora, ou das técnicas de preparo biomecânico do canal radicular na endodontia.

Sob o ponto de vista endodôntico, a adoção de técnicas que removam total ou parcialmente a lama dentinária é desejável, já que sua permanência promove a diminuição da permeabilidade dentinária, interferindo diretamente sobre a efetividade das medicações intracanaís e adesão de cimentos às paredes dentinárias^{6-8,22}. Em situações específicas, como no uso de biomateriais para o tratamento de perfurações em paredes radiculares, foi demonstrada maior interação

adesiva entre os substratos, quando da remoção total da lama dentinária das paredes dos canais radiculares²³.

Sob o ponto de vista restaurador, a presença da lama dentinária pode interferir, negativamente, na adesão de materiais sobre o substrato dentinário^{5,24}, seja com a utilização de cimentos de ionômero de vidro, de sistemas ou cimentos adesivos. Com relação à adesão intra-canal, demonstrou-se que a presença da lama dentinária pode afetar a união de pinos pré-fabricados à dentina, especificamente dos pinos de fibra de vidro, em que o melhor resultado adesivo pode ser obtido com a remoção da lama dentinária²⁴.

No presente trabalho, a metodologia proposta avaliou a ação de dois agentes quelantes utilizados na endodontia para remoção da lama dentinária, EDTA 17% e quitosana 0,2%, sobre os procedimentos restauradores executados com resina composta na região coronária dos dentes, local onde se realiza o acesso endodôntico inicial. Por meio do microcisalhamento se verificou que a resistência de união entre a resina composta e a dentina coronária foi potencializada com a remoção da lama dentinária, seja por meio do EDTA quanto da quitosana.

Apesar de ambas as substâncias atuarem de formas distintas na quelação do cálcio, pode-se supor, pelos resultados, que a ação de ambas foi equivalente na remoção da lama dentinária, como verificado em outras condições¹⁵⁻¹⁷. A solução de quitosana tem pH mais ácido por ser diluída em ácido acético 1%, e sua ação se baseia em duas teorias: a ligação do grupo amino da cadeia de quitosana se liga ao íon metálico (cálcio), ou seu grupo amino é envolvido na ligação, e por sua vez o íon metálico se ancora ao grupo amino²⁵. Ao contrário, o EDTA tem pH entre 7,0 e 7,3,¹⁰ e quando associado ao NaOCl, estes agem inclusive na remoção da porção orgânica da lama dentinária²⁶.

Ao contrário do presente trabalho, em que a quitosana foi utilizada isoladamente em solução, vários estudos indicaram a incorporação da quitosana a compósitos e agentes de adesão com o intuito de melhorar a capacidade antimicrobiana destes. Demonstrou-se que a incorporação de quitosana (0,03%, 0,06% e 0,12%) no primer de sistemas adesivos convencionais de três passos poderia ter potente efeito antibacteriano para *Enterococcus faecalis*, sem alterar os valores de resistência de união à dentina²¹. Quanto a incorporação de quitosana (0,12%) em um sistema adesivo experimental convencional de dois passos, verificou-se o efeito inibitório sobre o crescimento de *Streptococcus mutans*, porém a viscosidade do adesivo aumentou e houve alteração negativa quanto ao grau de conversão e diminuição do pH²⁷.

Quando associada a cimentos de ionômero de vidro, a presença de quitosana aumentou em 84% a adesão em comparação aos cimentos não modificados, provavelmente, pelo fato da atração polar e iônica entre os grupamentos carboxílicos do ácido poliácrico e a superfície dura dos dentes. Com sua ação quelante, a quitosana favoreceu a difusão de mais cadeias de ácido poliacrílico no esmalte e dentina, deslocando os íons fosfato e cálcio dos cristais

de hidroxiapatita, resultando em maior interação entre os substratos²⁸.

Em outra situação, na qual a quitosana não foi utilizada isoladamente, verificou-se que sua inserção para a modificação de ácido metacrílico em 16%, posteriormente misturado ao primer de um sistema convencional experimental de três passos resultou na presença de grupos metacrilatos, e por meio de cargas positivas residuais da quitosana houve a união covalentemente ao material restaurador, interagiram eletrostaticamente com a dentina desmineralizada, demonstrando a efetividade da técnica na durabilidade de restaurações dentárias²⁹.

E considerando os potenciais da riboflavina como agente antioxidante, e da quitosana como agente antibacteriano, estudos demonstraram que em uma proporção de 20% de quitosana em riboflavina, e sua aplicação em dentina previamente aos sistemas adesivos convencionais de três passos, observou-se maior infiltração do adesivo, além da modificação química da matriz colágena, induzindo a maior estabilização da camada híbrida resultante³⁰. Considerando a possível ação sinérgica da quitosana, nestas situações, concluiu-se que sua presença melhorou a estabilidade mecânica da dentina desmineralizada contra a degradação hidrolítica ou degeneração colágena, em períodos de ao menos seis meses³¹.

Assim, pode-se afirmar que os resultados apresentados encorajam o uso da quitosana nos procedimentos adesivos, seja pela remoção da lama dentinária, seja por sua ação antibacteriana, seja pela melhora das propriedades mecânicas de materiais restauradores adesivos, ou pela possibilidade de interação com outros componentes, a fim de proporcionar a estabilidade mecânica da dentina desmineralizada contra a degradação hidrolítica ou degeneração colágena.

Portanto, dentro dos limites do presente trabalho, conclui-se que o uso da quitosana em procedimentos endodônticos não interfere na resistência de união com as resinas compostas, e abre a possibilidade de mais estudos para determinar o potencial desta substância sobre os procedimentos adesivos de maneira em geral.

4 Conclusão

Considerando os limites do presente trabalho, conclui-se que a quitosana e o EDTA promovem junto à dentina a resistência de união semelhante nas condições testadas.

Referências

- Summitt JB, Robbins JW, Schwartz RS. Fundamentals of operative dentistry. São Paulo: Quintessence; 2001.
- Wu Y, Hu Y, Cai J, Ma S, Wang X. Coagulation property of hyaluronic acid-collagen/chitosan complex film. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(12):3621-9.
- Plotino G, Cortese T, Grande NM, Leonardi DP, Di Giorgio G, Testarelli L, *et al.* New Technologies to improve root canal disinfection. *Braz Dent J* 2016;27(1):3-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201600726>
- Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endod* 1984;10(10):477-83.
- Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics: a review. *Int Endod J* 2010;43(1):2-15.
- Cury JA, Bragotto C, Valdrighi L. The demineralizing efficiency of EDTA solutions on dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;52:446-8.
- Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(6):658-66.
- Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. *Int Endod J* 2005;38(5):285-90.
- Ostby BN. Seis anos de experiencia clinica y experimental com ácido etileno-diamino tetra-acetico (EDTA) como coadyuvante en la terapia de los conductos radiculares. *Rev Asoc Odont Argentina* 1962;50(2).
- Çalt S, Serper A. Smear layer removal by EDTA. *J Endod* 2000;26:459-61.
- Prado M, Gusman H, Gomes BPFA, Simão RA. Scanning Electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and Citric Acid. *J Endod* 2011;37(2):255-8. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.011.
- Jaworska JS, Schowanek D, Feijtel TC. Environmental risk assessment for trisodium [S,S]-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent applications. *Chemosphere* 1999;38(15):3597-625.
- Peter MG. Applications and environmental aspects of chitin end chitosan. *J Macromol Sci* 1995;A32:629-40.
- Saker S, Alnazzawi A, Özcan M. Adhesive strength of self-adhesive resins to lithium disilicate ceramic and dentin: effect of dentin chelating agents. *Odontology* 2016;104(1):53-9. doi: 10.1007/s10266-014-0180-3
- Pimenta JA, Zapparolli D, Pécora JD, Cruz-filho AM. Chitosan: effect of a new chelating agent on the microhardness of root dentin. *Braz Dent J* 2012;23(3):212-7.
- Silva PG, Nakadi FV, Pécora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. *Int Endod J* 2013;46:332-8.
- Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MA, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod* 2015;40(3):195-201. doi: 10.5395/rde.2015.40.3.195.
- DaSilva L, Finer Y, Friedman S, Basrani B, Kishen A. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *J Endod* 2013;39(2):249-53. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.008.
- Syedmajidi M, Rabiee S, Haghaniifar S, Syedmajidi S, Jorsaraei SG, Alaghehmand H, *et al.* Histopathological, histomorphometrical, and radiographical evaluation of injectable glass-ceramic-chitosannanocomposite in bone reconstruction of rat. *Int J Biomater* 2015;2015:1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/719574>
- Costa EM, Madureira AR, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK, Pintado MM. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm

- formation in vitro. *Carbohydr Polym* 2014;30(101):1081-6.
21. Elsaka S, Elnaghy A. Effect of addition of chitosan to self-etching primer: antibacterial activity and push-out bond strength to radicular dentin. *J Biomed Res* 2012;26(4):288-94. doi: 10.7555/JBR.26.20120042
 22. Shahraavan A, Haghdoost AA, Adl A, Rahimi H, Shadifar F. Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. *J Endod* 2007;33(2):96-105.
 23. Lotfi M, Ghasemi N, Rahimi S, Bahari M, Vosoughhosseini S, Saghiri MA, Zand V. Effect of smear layer on the push-out bond strength of two endodontic biomaterials to radicular dentin. *Iran Endod J* 2014;9(1):41-4.
 24. Zorba YO, Erdemir A, Turkyilmaz A, Eldeniz AU. Effects of different curing units and luting agents on push-out bond strength of translucent posts. *J Endod* 2010;36(9):1521-5.
 25. Blair HS, Ho TC. Studies in the adsorption and diffusion of ions in chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1981;31:6-10.
 26. Mello I, Kammerer BA, Yoshimoto D, Macedo MCS, Antoniazzi JH. Influence of final rinse technique on ability of Ethylenediaminetetraacetic Acid of removing smear layer. *J Endod* 2010;36(3):512-4.
 27. Elsaka SE. Antibacterial activity and adhesive properties of a chitosan-containing dental adhesive. *Quintessence Int* 2012;43(7):603-13.
 28. Debnath A, Kesavappa SB, Singh GP, Eshwar S, Jain V, Swamy M, Shetty P. Comparative evaluation of antibacterial and adhesive properties of chitosan modified glass ionomer cement and conventional glass ionomer cement: an in vitro study. *J Clin Diagn Res* 2017;11(3):ZC75-ZC78. doi: 10.7860/JCDR/2017/25927.9593.
 29. Diolosa M, Donati I, Turco G, Cadenaro M, Di Lenarda R, Breschi L, Paoletti S. Use of methacrylate-modified chitosan to increase the durability of dentine bonding systems. *Biomacromolecules* 2014;15(12):4606-13.
 30. Daood U¹, Iqbal K, Nitisusanta LI, Fawzy AS. Effect of chitosan/riboflavin modification on resin/dentin interface: spectroscopic and microscopic investigations. *J Biomed Mater Res A* 2013;101(7):1846-56. doi: 10.1002/jbm.a.34482.
 31. Fawzy AS, Nitisusanta LI, Iqbal K, Daood U, Beng LT, Neo J. Chitosan/Riboflavin-modified demineralized dentin as a potential substrate for bonding. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013;17:278-89. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.09.008.