

FRANCISCO IVISON RODRIGUES LIMEIRA

**EFEITO DA IDADE NOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS, QUÍMICOS E
FÍSICOS DAS DENTINAS RADICULARES HUMANA E BOVINA**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2019**

Francisco Ivison Rodrigues Limeira

EFEITO DA IDADE NOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS, QUÍMICOS E FÍSICOS DAS DENTINAS RADICULARES HUMANA E BOVINA

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Odontologia – área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Silami de Magalhães

Coorientador: Prof. Dr. Allyson Nogueira Moreira

Belo Horizonte
2019

Ficha Catalográfica

L733e Limeira, Francisco Ivison Rodrigues.
2019 Efeito da idade nos aspectos morfológicos, químicos e
T físicos das dentinas radiculares humana e bovina / Francisco
Ivison Rodrigues Limeira. -- 2019.

138 f. : il.

Orientadora: Cláudia Silami de Magalhães.

Coorientador: Allyson Nogueira Moreira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Dentina. 2. Raiz dentária. 3. Microscopia. 4. Análise
físico-química. 5. Mecânica. I. Magalhães, Cláudia Silami
de. II. Moreira, Allyson Nogueira. III. Universidade Federal
de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Efeito da idade nos aspectos morfológicos, químicos e físicos das dentinas radiculares humana e bovina

FRANCISCO IVISON RODRIGUES LIMEIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor, área de concentração Clínica Odontológica.

Aprovada em 31 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Claudia Silami de Magalhaes - Orientadora
FO-UFMG

Prof(a). Allyson Nogueira Moreira - Coorientador
FO-UFMG

Prof(a). Roberta Tarkany Basting Höfling
Faculdade/Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic

Prof(a). Vinicius de Magalhães Barros
PUC MINAS

Prof(a). Walison Arthuro Vasconcellos
FO-UFMG

Prof(a). Carolina Nemésio de Barros Pereira
UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2019.

A Deus, pois tudo posso Naquele que me fortalece. À minha avó Olívia, de onde eu herdei a minha força. Aos meus pais, Ney e Fátima, por respeitarem as minhas escolhas e por todo o incentivo. Ao meu amigo Régis, meu anjo-da-guarda aqui na terra. Às minhas sobrinhas Ana Elisa, Maria Alice e Maria Helena, meus pedacinhos de amor.

AGRADECIMENTOS

A professora Dra. Cláudia Silami de Magalhães, por ter sido uma orientadora tão comprometida com o nosso trabalho, por sempre apoiar e lapidar as minhas ideias para o estudo e, sobretudo, por reconhecer a minha dedicação nesses anos de convivência. Obrigado pela orientação sempre aberta aos meus questionamentos e por conseguir guiar-me com tamanha sabedoria. Manifesto minha gratidão por todos os ensinamentos compartilhados, conselhos dados e momentos vividos.

Ao professor Dr. Allyson Nogueira Moreira, meu orientador durante o início do curso de doutorado. Agradeço por todas as contribuições dadas durante a condução dos trabalhos, sempre de maneira prática e objetiva, característica que lhe é peculiar. Agradeço por todo o zelo com a nossa área de concentração e com todos os seus alunos.

A professora Dra. Monica Yamauti, por todo acolhimento e cuidado, desde o início do curso. Agradeço por todas as sugestões e esclarecimentos durante o delineamento e execução do estudo, por todo o estímulo e pelas oportunidades de crescimento profissional. Tenho muita gratidão pelo nosso encontro.

A professora Dra. Patrícia Meira Bento, que há dez anos deu-me a primeira oportunidade de iniciar minha trajetória na pesquisa científica, quando fui seu bolsista, e durante o curso de mestrado na Universidade Estadual da Paraíba. Durante todo esse tempo sempre lhe fui muito grato e, com a conclusão do meu doutorado, reitero a minha gratidão e compartilho com a professora a concretização deste sonho.

A Deus, por toda sua misericórdia e por me dar força e sabedoria para lutar pelos meus sonhos. Agradeço pela proteção e por escolher para mim os melhores caminhos.

Aos meus pais, por toda a dedicação e zelo que tiveram durante a minha trajetória estudantil, concedendo-me as melhores oportunidades, dentro da nossa realidade. A concretização deste sonho é mais um fruto da educação e apoio que recebi de vocês.

Ao meu amigo Régis. Tê-lo comigo é ter a certeza que jamais estarei sozinho. Você tem uma enorme parcela de contribuição nesta conquista. Só Deus para retribuí-lo!

Ao Henrique, por todo incentivo, reconhecimento do meu esforço, torcida e por ser uma referência de ser humano e profissional. Compartilhar a minha vida com você deixou o percurso mais leve e feliz.

A todos os meus amigos que, mesmo distantes, torcem pelo meu sucesso: Ana Cláudia, Márcio, Halmério, Ravena, Ana Alini, Eveline, Yuri e Chris.

À Tassiana, amiga e colega de doutorado. Conviver com você durante esses anos foi extremamente prazeroso. Você é uma pessoa boníssima, a quem eu desejo o melhor.

À Carla, Diandra, Monize e Tuélita, amigas que ganhei durante o doutorado. Agradeço pela convivência prazerosa, confidências trocadas e bons momentos compartilhados.

Aos demais amigos e colegas que cruzaram o meu caminho durante o doutorado: Ingrid, Juliana, Caroline, Ricardo, Rafaela, Daniel e Caio.

Ao professor Dr. Cristiano Fantini, do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, por ter viabilizado a execução de parte dos experimentos no Laboratório de Espectroscopia Raman. Agradeço também à Viviane, por todas as contribuições dadas e tempo dispensado com as minhas análises.

Ao Laboratório de Pesquisa de Materiais Odontológicos da Faculdade de Odontologia da UFMG, por possibilitar a execução deste estudo.

Ao Biobanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da UFMG, por disponibilizar os dentes humanos necessários ao estudo.

Ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia, por possibilitar uma formação de excelência aos seus alunos. A todos os professores que compõem o corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG, por todos os ensinamentos. Agradeço carinhosamente às secretárias do Colegiado, Laís, Luciene, Letícia e Valéria, por toda a gentileza.

À Faculdade de Odontologia da UFMG e, em especial, ao Departamento de Odontologia Restauradora, por atender com prontidão às demandas dos alunos da área de clínica odontológica, e ao Departamento de Odontologia Social e Preventiva,

que me recebeu tão bem como professor do curso de formação de Auxiliar em Saúde Bucal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da minha bolsa de estudo durante todo o curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por disponibilizar o recurso financeiro necessário para execução deste trabalho.

Ao Centro de Microscopia da UFMG, por todo o suporte dado durante as análises deste estudo.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de ter cursado o meu doutorado em uma Instituição de Ensino Superior tão respeitada.

A todas as pessoas não mencionadas aqui, que de alguma forma já cruzaram o meu caminho e incentivaram-me à realização deste sonho. Minha eterna gratidão!

“Eu sou de uma terra que o povo padece
Mas nunca esmorece, procura *vencê*...
Não nego meu sangue, não nego meu nome”

Patativa do Assaré

RESUMO

Dentes bovinos têm sido utilizados como substitutos aos humanos em pesquisas odontológicas. Entretanto, faltam dados que suportem o uso da dentina radicular bovina, sobretudo, que analisem o efeito da idade nas propriedades do substrato. Assim, analisou-se o efeito da idade nos aspectos morfológicos, químicos e físicos das dentinas radiculares humana e bovina, em função dos terços da raiz. Trata-se de um estudo experimental, *in vitro*, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP-UFMG 1.803.933) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG 372/2016). A amostra foi composta por dentes unirradiculares, cujas dentinas radiculares foram categorizadas em: humana jovem (HJ, 20-30 anos); humana madura (HM, acima de 60 anos); bovina jovem (BJ, 24-36 meses); e bovina adulta (BA, acima de 48 meses). Os dentes foram seccionados abaixo da junção amelocementária e ao longo eixo da raiz, para a obtenção de hemiseções. Uma hemiseção foi escolhida e cortes foram feitos para a obtenção dos espécimes, conforme cada método de análise. Para as análises dos aspectos morfológicos — número, diâmetro e área dos túbulos dentinários — os espécimes foram analisados em Microscópio Eletrônico de Varredura. A composição química foi analisada por Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia, Espectroscopia por Comprimento de Onda Dispersivo e Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier. Na análise das propriedades mecânicas, os espécimes foram submetidos aos testes de nanoindentação, resistência à flexão em três pontos e compressão. Para a análise da resistência ao cisalhamento por extrusão, as raízes receberam tratamento endodôntico e foram fixados pinos de fibra de vidro com cimentos resinosos (dual convencional e autoadesivo). As raízes foram seccionadas nos terços radiculares e os espécimes testados em máquina universal de ensaios. Adicionalmente, avaliou-se o grau de conversão dos cimentos resinosos. Os dados foram analisados em *software* estatístico, nível de significância de 5%. A HM apresentou os menores valores para número, diâmetro e área de túbulos dentinários ($p < 0,05$). A HM apresentou maiores valores de cálcio, razão Ca/P e concentração mineral relativa, com diminuição na organização e qualidade do colágeno ($p < 0,05$). A HM apresentou os maiores valores de nanodureza, módulo de elasticidade e resistência à compressão, mas os menores valores de resistência à flexão e módulo de elasticidade à flexão ($p < 0,05$). A HM apresentou os menores valores de resistência de união, com diferenças entre os terços radiculares ($p < 0,05$). O grau de conversão dos cimentos apresentou uma diminuição ao longo dos terços radiculares ($p < 0,05$). Concluiu-se que a idade possui um efeito nos aspectos morfológicos, químicos e físicos da dentina radicular humana, sem efeito na dentina bovina. Assim, quando da necessidade de substituição da dentina radicular humana pela bovina em pesquisas, é necessário considerar o efeito da idade nos desfechos analisados.

Palavras-chaves: Dentina. Raiz dentária. Microscopia. Análise físico-química. Mecânica. Testes de dureza. Resistência à flexão. Fraturas por compressão. Pinos dentários. Cimentos de resina.

ABSTRACT

The effect of age on morphological, chemical and physical aspects of human and bovine root dentin

Bovine teeth have been used as a substitute for human teeth in dental research. However, there is a lack of data that support the use of bovine root dentin, mainly, that analyze the effect of age on the properties of the substrate. Thus, the effect of age on the morphological, chemical and physical aspects of human and bovine root dentin was analyzed, in function of the root thirds. This is an in vitro experimental study, approved by the Research Ethics Committee (protocol number: 1.803.933) and the Ethics Committee on the Use of Animals (protocol number: 372/2016). The sample was composed of single-rooted teeth and root dentin was categorized into: young human (YH, 20-30 years); old human (OH, above 60 years); young bovine (YB, 24-36 months); and adult bovine (AB, over 48 months). The roots were sectioned below the cement-enamel and longitudinally to produce two hemi-sections. One hemi-section was chosen and sections were made to obtain the specimens, according to each method of analysis. For the analyzes of the morphological aspects - number, diameter and area of the dentinal tubules - the specimens were analyzed in Scanning Electron Microscope. The chemical composition was analysed by Energy Dispersive Spectroscopy, Wavelength Dispersive Spectroscopy and Fourier Transformed Raman Spectroscopy. In the analysis of the mechanical properties, the specimens were submitted to nano-indentation, three-point flexural and compression tests. For the analysis of the push-out bond strength test, the roots received endodontic treatment and fiber post with resin cements (conventional and self-adhesive dual) were fixed. The roots were sectioned in the root thirds and the specimens tested in a universal testing machine. Additionally, the degree of conversion of the resin cements was evaluated. The data were analyzed in statistical software, level of significance of 5%. The OH presented the lowest values for number, diameter and area of dentinal tubules ($p < 0.05$). OH showed higher values of calcium, Ca/P ratio and relative mineral concentration, with decrease in the organization and quality of the collagen ($p < 0.05$). The OH showed the highest values of nano-hardness, elastic modulus and compressive strength, but the lowest values of flexural strength and flexural modulus ($p < 0.05$). The OH presented the lowest values of bond strength, with differences among the root thirds ($p < 0.05$). The degree of conversion of the cements showed a decrease along the root thirds ($p < 0.05$). It was concluded that age has an effect on the morphological, chemical and physical aspects of human root dentin, with no effect on bovine dentin. Thus, when it is necessary to replace the human root dentin by the bovine in research, it is necessary to consider the effect of age on the analysed outcomes.

Keywords: Dentin. Tooth root. Microscopy. Physicochemical analysis. Mechanics. Hardness tests. Flexural strength. Fractures compression. Dental pins. Resin cements.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01 - Divisão dos dentes segundo os fatores estudados na análise morfológica das dentinas radiculares humana e bovina. 24
- Figura 02 - Preparo dos espécimes. **a.** Dente bovino fixado na placa de acrílico, **b.** Dente sendo seccionado abaixo da junção amelocementária, **c.** Raiz fixada na placa de acrílico para realizar a secção longitudinal, **d.** Hemisecções da raiz. 25
- Figura 03 - **a.** Espécimes embutidos em resina ortoftática, **b.** Polimento dos espécimes com lixa de carbureto de silício, **c.** Polimento dos espécimes com pastas diamantadas em disco de feltro. 26
- Figura 04 - **a.** Delimitação dos terços radiculares nos espécimes, **b.** Espécimes em sílica gel, **c.** Espécimes revestidos por carbono. 26
- Figura 05 - **a.** Contagem do número de túbulos dentinários, **b.** Medição do diâmetro dos túbulos dentinários, **c.** Medição da área dos túbulos dentinários. 27
- Figura 06 - Resultados do mapeamento elementar da amostra por EDS. 29
- Figura 07 - **a.** Dente posicionado na cortadeira metalográfica de precisão para o corte abaixo da junção amelocementária, **b.** Raiz fixada na placa de acrílico para a realização da secção longitudinal, **c.** Hemisecção da raiz, **d.** Hemisecção seccionada entre os terços radiculares. 30
- Figura 08 - **a.** Polimentos dos espécimes com lixas de carbureto de silício, **b.** Espécimes armazenados em tubos *ependorf*. 31
- Figura 09 - **a.** Equipamento Raman utilizado, **b.** Espécime posicionado no equipamento para análise. 32
- Figura 10 - Exemplo de um espectro obtido com a identificação dos picos estudados na análise química. 33
- Figura 11 - **a.** Dente posicionado na cortadeira metalográfica de precisão para o corte abaixo da junção amelocementária, **b.** Raiz fixada na placa de acrílico para a realização da secção longitudinal, **c.** Hemisecção da raiz, **d.** Hemisecção seccionada entre os terços 35

radiculares.

- Figura 12 - **a.** Espécimes embutidos em resina ortoftálica, **b.** Polimento do espécime com lixas de carbureto de silício, **c.** Polimento do espécime com discos de feltro e pastas diamantadas. 36
- Figura 13 - **a.** Dente fixado em placa de acrílico com cera pegajosa, **b.** Remoção da coroa com disco adiamantado em cortadeira metalográfica, **c.** Raiz após a realização dos dois cortes paralelos ao longo eixo da raiz. 37
- Figura 14 - **a.** Espécime obtido fixado em placa de acrílico para realização de outros cortes conferindo-lhe um formato de barra, **b.** Espécime após os cortes, **c.** Duas barras de dentina (1 mm x 1 mm x 10 mm). 38
- Figura 15 - **a.** Espécime de dentina mantido em solução salina, **b.** Espécime posicionado na máquina universal de ensaios, **c.** Espécime em teste de flexão em três pontos. 38
- Figura 16 - **a.** Remoção da coroa com disco adiamantado em cortadeira metalográfica, **b.** Raiz após a remoção da coroa fixada em placa de acrílico, **c.** Raiz após a realização dos dois cortes paralelos ao longo eixo da raiz. 39
- Figura 17 - **a.** Espécime de dentina fixado em placa de acrílico com dois cortes paralelos ao seu longo eixo, **b.** Espécime de dentina em forma de barra com as demarcações para a obtenção dos corpos de prova, **c.** Espécimes de dentina em formato cuboide obtidos após os cortes. 40
- Figura 18 - **a.** Espécime posicionado entre os dispositivos para a realização do teste de compressão uniaxial, **b.** Espécime em teste de compressão, **c.** Espécime após o teste. 41
- Figura 19 - **a.** Dente fixado na placa de acrílico, **b.** Dente sendo seccionado abaixo da junção amelocementária em cortadeira metalográfica, **c.** Padronização do comprimento das raízes, **d.** Padronização do diâmetro do conduto, **e.** Exemplo de raiz que foi descartada por apresentar um conduto onde a broca conseguia penetrar mais 42

	que 1/3 da ponta ativa.	
Quadro 01 -	Materiais utilizados na cimentação dos pinos de fibra de vidros e suas composições.	44
Quadro 02 -	Descrição do protocolo de cimentação dos pinos de fibra de vidro de acordo com o cimento resinoso utilizado.	45
Figura 20 -	a. Raiz com pino de fibra de vidro cimentado fixada na placa de acrílico para o corte, b. Raiz sendo seccionada perpendicularmente ao seu longo eixo, c. Raiz com as várias secções.	46
Figura 21 -	a. Espécimes obtidos em cada terço radicular, b. Verificação da espessura do espécime, c. Espécime posicionado sobre a base metálica para ser submetido ao teste, d. Espécime com deslocamento do pino após teste.	47
Figura 22 -	Representação esquemática do formato cônico do fragmento do pino.	47
Figura 23 -	a. Espécimes fraturados sendo analisados em estereomicroscópio, b. Representação dos modos de fraturas observados nos espécimes.	48
Figura 24 -	a. Cimento resinoso inserido no dispositivo metálico para obtenção dos espectros do cimento não polimerizado, b. Espécime do grupo experimental sendo analisado, c. Imagem da linha de cimentação obtida com o aumento de 10X identificando a área de análise.	50
Figura 25 -	Espectros obtidos com os cimentos não polimerizado e polimerizado, em destaques os picos 1609 cm^{-1} e 1637 cm^{-1} .	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrometro
μN	Micronewton
BDH	Biobanco de Dentes Humanos
Ca	Cálcio
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
Ca/P	Razão Cálcio/Fosfato
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
EDS	Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FT-Raman	Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier
<i>FWHM</i>	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GPa	Gigapascal
kV	Quilovolts
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Magnésio
ml	Milímetro
MgO	Óxido de Magnésio
mm	Milímetro
MPa	Megapascal
AFM	Microscópio de Força Atômica
MPE	Magnitude Padronizada de Efeito
mW	Milivolt
nA	Nanoampère
N	Newton
Nd:YAG	<i>Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet</i>
$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pirofosfato de Cálcio

Na Sódio
nm Nanômetro
P Fósforo
rpm Rotações por minuto
SPSS Statistical Product and Service Solutions
UFMG Universidade Federal de Minas Gerais
WDS Espectroscopia por Comprimento de Onda Dispersivo

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	17
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivo Geral.....	21
2.2	Objetivos Específicos.....	21
3	MÉTODOLOGIA EXPANDIDA.....	22
3.1	Delineamento do Estudo.....	22
3.2	Aspectos Éticos.....	22
3.3	Amostra.....	23
3.3.1	Seleção dos Dentes Humanos.....	23
3.3.2	Seleção dos Dentes Bovinos.....	23
3.4	Análise Morfológica.....	24
3.4.1	Preparo dos Dentes.....	24
3.4.2	Obtenção das Imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura.....	26
3.5	Análise Química.....	28
3.5.1	Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS) e Espectroscopia por Comprimento de Onda Dispersivo (WDS).....	28
3.5.1.1	Preparo dos dentes.....	28
3.5.1.2	Análise por EDS e WDS.....	28
3.5.2	Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman).....	29
3.5.2.1	Preparo dos dentes.....	30
3.5.2.2	Análise por FT-Raman.....	31
3.6	Análise Física.....	34
3.6.1	Teste de Nanoindentação.....	34
3.6.1.1	Preparo dos dentes.....	34
3.6.1.2	Análise da dureza e do módulo de elasticidade.....	36
3.6.2	Ensaio de Resistência à Flexão em Três Pontos.....	36
3.6.2.1	Preparo dos dentes.....	36

3.6.2.2	Análise da resistência à flexão e módulo de elasticidade à flexão.....	38
3.6.3	Ensaio de Compressão.....	39
3.6.3.1	Preparo dos dentes.....	39
3.6.3.2	Análise da resistência à compressão e módulo de elasticidade.....	40
3.6.4	Teste de Resistência ao Cisalhamento por Extrusão (<i>push-out</i>).....	41
3.6.4.1	Cálculo amostral.....	41
3.6.4.2	Preparo dos dentes.....	42
3.6.4.3	Tratamento endodôntico das raízes.....	43
3.6.4.4	Preparo radicular para cimentação dos pinos.....	43
3.6.4.5	Protocolos de cimentação.....	43
3.6.4.6	Obtenção dos espécimes e teste de resistência ao cisalhamento por extrusão.....	46
3.6.4.7	Análise do padrão de fratura.....	47
3.6.4.8	Avaliação da qualidade da linha de cimentação.....	47
3.6.5	Análise do Grau de Conversão dos Cimentos Resinosos.....	49
3.7	Análise dos Dados.....	51
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Artigo 1.....	54
4.2	Artigo 2.....	92
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
	REFERÊNCIAS.....	127
	ANEXO A.....	135
	ANEXO B.....	136
	ANEXO C.....	137
	ANEXO D.....	138

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O uso de dentes humanos em pesquisas odontológicas *in vitro* apresenta limitações quanto à dificuldade de obtenção de uma amostra quantitativamente suficiente, com qualidade e padronização adequada (variações na fonte e idade), além dos aspectos éticos envolvidos (CAMARGO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2015; MELLBERG 1992; SOARES *et al.*, 2016; YASSEN *et al.*, 2011). Assim, dentes bovinos têm sido utilizados como substitutos aos dentes humanos, pois possuem semelhanças em suas propriedades morfológicas e físico-químicas (HETRODT *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2018; TERUEL *et al.*, 2015; ULUSOY *et al.*, 2018; YASSEN *et al.*, 2011).

Embora existam dados que substanciem o uso de dentes bovinos em substituição aos dentes humanos quando utilizados substratos coronários, ainda não há dados conclusivos na literatura sobre a caracterização da dentina radicular bovina e a sua viabilidade na substituição da dentina radicular humana (CAMARGO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2015; SCHILKE *et al.*, 2000; YASSEN *et al.*, 2011). Apesar disso, os canais radiculares bovinos têm sido utilizados para a análise da penetração de medicações endodônticas, substâncias químicas auxiliares e de materiais de preenchimento, contaminação de túbulos dentinários e resistência de união adesiva (ARIAS *et al.*, 2016; BOHRER *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2003; GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2009; NAKAMOTO *et al.*, 2019; PALO *et al.*, 2012).

A dentina é a porção de tecido mineralizado do complexo dentinopulpar e representa a maior parte do dente. Em volume, consiste em aproximadamente 45% de conteúdo mineral (basicamente a hidroxiapatita), 33% de material orgânico (principalmente o colágeno tipo I, com pequenas quantidades dos tipos III e V) e 22% de água (TJÄDERHANE, 2012). A dentina tem uma estrutura hierárquica, na qual moléculas de colágeno e apatita se cruzam em escala nanométrica. Posteriormente, esses compósitos se organizam em uma morfologia microscópica, formando os túbulos dentinários com diferentes tamanhos e densidades (KATZ *et al.*, 2007). A dentina é amplamente ocupada por seus túbulos dentinários, responsáveis por abrigar os processos odontoblásticos (GOLDBERG *et al.*, 2011;

TJÄDERHANE *et al.*, 2012). Cada lúmen tubular é envolto por dentina peritubular, que contém principalmente cristais de apatita e uma pequena proporção de proteínas orgânicas. Os espaços entre os túbulos dentinários são ocupados pela dentina intertubular, que possui uma matriz de fibras de colágeno reforçadas por apatita (MARSHALL *et al.*, 1997). A dentina apresenta tenacidade, propriedade importante para o funcionamento propriamente dito do dente, uma vez que a elasticidade proporciona flexibilidade e previne fraturas do esmalte suprajacente, de natureza friável (NANCI, 2013). Com base em sua composição e estrutura, a dentina é considerada um composto biológico hierárquico (ZISKIND *et al.*, 2011).

Estudos que comparam as dentinas radiculares humanas e bovinas em diferentes áreas da pesquisa odontológica são comuns (CAMARGO *et al.*, 2006; CAMARGO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2015; GALHANO *et al.*, 2009; HARA *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2011; LIPPERT *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2016; WEGEHAUPT *et al.*, 2010; YASSEN *et al.*, 2011). Em relação aos aspectos morfológicos da dentina radicular humana, a dentina radicular bovina parece apresentar uma maior densidade de túbulos dentinários, sem diferenças quanto aos diâmetros dos túbulos (CAMARGO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2015; SHILKE *et al.*, 2000). Quanto aos aspectos químicos e mecânicos da dentina radicular, não existem estudos que comparam os substratos humano e bovino.

A dentina é altamente afetada pela idade em suas propriedades, devido às suas características dinâmicas (AROLA; REPROGEL 2005; BAJAJ *et al.*, 2006; SENAWONGSE *et al.*, 2006). A espessura da dentina tende a aumentar com o envelhecimento, como resultado do crescimento aposicional (GOLDBERG *et al.*, 2011; TJÄDERHANE *et al.*, 2012). Após a terceira década de vida ocorre uma transição na microestrutura da dentina humana, na qual os túbulos se tornam gradativamente preenchidos com material inorgânico (KINNEY *et al.*, 2005). Depois de um número significativo de túbulos dentinários ter sido preenchido, o tecido apresenta um aspecto transparente (considerado "esclerótico"), resultado do aumento no conteúdo mineral, com maior risco de ocorrência de fraturas (KINNEY *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2014). Entretanto, apenas o estudo de Camargo *et al.* (2007), analisou o efeito da idade nas características morfológicas do substrato dentinário radicular humano e bovino, onde não foi observado efeito da idade nos aspectos analisados.

Dentes bovinos têm sido utilizados há muito tempo como uma alternativa aos dentes humanos em testes de adesão na dentina radicular (DALEPRANE *et al.*, 2016; NAKAMOTO *et al.*, 2019; PULIDO *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2007). Duas recentes revisões sistemáticas com metanálises que compararam a resistência de união adesiva de dentes humanos e bovinos em estudos *in vitro*, concluíram que os dentes bovinos podem ser considerados um substituto confiável aos dentes humanos em testes de resistência de união de materiais adesivos (CARVALHO *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2016). Entretanto, dos artigos incluídos nestas revisões, apenas um comparou a resistência de união de pinos de fibra à dentina humana e bovina, onde foi observado um maior valor de resistência de união no substrato humano (GALHANO *et al.*, 2009). No entanto, o tamanho da amostra do estudo não foi definido por cálculo amostral, a idade dentária não foi padronizada, não houve tratamento endodôntico dos canais radiculares e a resistência de união não foi avaliada por terço radicular.

A adesão à dentina ainda não alcançou características ideais como devido à sua estrutura tubular, conteúdo orgânico e umidade intrínseca (KINNEY *et al.*, 2005). Como a permeabilidade dentinária é um fator importante no processo de adesão, a redução da permeabilidade com a idade pode ter um efeito direto sobre a resistência de união à dentina (KINNEY *et al.*, 2005; PERDIGÃO 2010). Apesar do aumento da calcificação dentinária com a idade, os estudos que avaliaram a adesão ainda não mostraram uma associação óbvia entre a idade da dentina coronária e a capacidade de adesão de materiais adesivos (OZER *et al.*, 2005; BRACKETT *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2012; PERDIGÃO *et al.*, 2013), sem estudos avaliando o efeito da idade sobre a adesão na dentina radicular.

Cimentos resinosos e pinos de fibra são boas escolhas para restaurações de dentes tratados endodonticamente (CHEUNG *et al.*, 2005). Entretanto, estudos clínicos mostraram que as fraturas pós-operatórias e o descolamento são os tipos mais frequentes de falhas observados (FERRARI *et al.*, 2000; SIGNORE *et al.*, 2009; NAUMANN *et al.*, 2012). Vários fatores podem influenciar na resistência de união de pinos ao canal radicular, incluindo a profundidade do canal, o tipo de cimento resinoso utilizado e as características do substrato dentinário (DALEPRANE *et al.*, 2014). Por este motivo, é importante investigar os demais fatores que possam

influenciar na resistência de união de pinos de fibras de vidro em estudos que comparam diferentes substratos dentinários.

Assim, diante das poucas evidências científicas disponíveis acerca do efeito da idade nas propriedades das dentinas radiculares humanas e bovinas, esta pesquisa teve por objetivo analisar o efeito da idade nos aspectos morfológicos, químicos e físicos das dentinas radiculares humana e bovina, em função dos diferentes terços da raiz, com fins a gerar novas evidências que possam subsidiar o uso da dentina radicular bovina em substituição à humana em pesquisas *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito da idade nos aspectos morfológicos, químicos e físicos das dentinas radiculares humana e bovina, em função dos diferentes terços da raiz.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as características morfológicas das dentinas radiculares humana e bovina de diferentes faixas etárias, quanto ao número, diâmetro e área dos túbulos dentinários.
- Avaliar o efeito da idade na composição química inorgânica e orgânica das dentinas radiculares humana e bovina.
- Comparar os valores de nanodureza, módulo de elasticidade à nanoindentação, resistência à flexão, módulo de elasticidade à flexão, resistência à compressão e módulo de elasticidade à compressão das dentinas radiculares humana e bovina de diferentes faixas etárias.
- Avaliar a resistência de união adesiva, o padrão de falha na área de união e a linha de cimentação de pinos de fibra de vidro fixados com cimentos resinosos aos condutos radiculares de dentes humanos e bovinos de diferentes faixas etárias.
- Avaliar o grau de conversão dos cimentos resinosos duais (*RelyX Ultimate* — convencional — com sistema adesivo autocondicionante e *RelyX U200* — autoadesivo) utilizados na fixação de pinos de fibra de vidro aos condutos radiculares, nos diferentes terços da raiz.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1 Delineamento do Estudo

Caracteriza-se como um estudo experimental, *in vitro*, quantitativo. Foram realizadas análises dos aspectos morfológicos, químicos e físicos, das dentinas radiculares humana e bovina, variando a faixa etária e os terços radiculares.

Foram estudados os seguintes fatores: faixa etária da dentina (jovem e madura/adulta), origem da dentina (humana e bovina) e os terços radiculares (cervical, médio e apical). As variáveis respostas foram: número, diâmetro e área dos túbulos dentinários — aspectos morfológicos; conteúdo mineral de cálcio, fósforo, sódio, magnésio, razão cálcio/fósforo, concentração mineral relativa, gradiente em conteúdo mineral, cristalinidade e natureza do colágeno — aspectos químicos; nanodureza, módulo de elasticidade à nanoindentação, resistência à flexão, módulo de elasticidade à flexão, resistência à compressão, módulo de elasticidade à compressão, resistência de união adesiva, padrão de falha na área de união, características da linha de cimentação e grau de conversão dos cimentos resinosos utilizados — aspectos físicos.

As dentinas radiculares humana e bovina foram categorizadas em faixas etárias: humana jovem (entre 20 e 30 anos); humana madura (acima de 60 anos); bovina jovem (entre 24 e 36 meses); e bovina adulta (acima de 48 meses).

3.2 Aspectos Éticos

Seguindo os preceitos estabelecidos pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, antes da realização do estudo, o projeto de pesquisa foi registrado na Plataforma Brasil e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para avaliação, obtendo parecer favorável à sua execução, com o número CAAE – 60935616.0.0000.5149 (ANEXO A).

O projeto foi também submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, que estabelece normas gerais para a utilização de animais em pesquisas científicas, obtendo parecer favorável à sua execução, com o número 372/2016 (ANEXO B).

3.3 Amostra

3.3.1 Seleção dos Dentes Humanos

Foram utilizados dentes fornecidos pelo Biobanco de Dentes Humanos (BDH) da Faculdade de Odontologia da UFMG. Os dentes do BDH encontram-se limpos e armazenados em temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todos os dentes selecionados possuíam o termo de doação ao BDH (ANEXO C), constando a data de nascimento do doador e data de doação. Foram incluídos dentes permanentes unirradiculares (incisivo central, incisivo lateral, canino e pré-molar) que apresentavam raiz íntegra, reta e com comprimento aproximado de 16 mm. Dentes que apresentavam reabsorção radicular ou trincas foram excluídos. Com antecedência de 96 horas antes do preparo para cada teste, os dentes foram descongelados e armazenados em água destilada a $4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para evitar a desidratação.

3.3.2 Seleção dos Dentes Bovinos

Foram incluídos dentes unirradiculares (primeiro incisivo, segundo incisivo, terceiro incisivo e canino) extraídos após abate dos animais em frigorífico, sob a responsabilidade de um médico veterinário, de acordo com as normas sanitárias e com certificação da faixa etária (ANEXO D).

Todos os dentes foram limpos com curetas periodontais, para remoção do ligamento periodontal e debris. Os dentes foram mantidos em recipientes plásticos e congelados a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram utilizados dentes com similaridade anatômica aos dentes humanos unirradiculares (diâmetro e comprimento aproximado de 16 mm), sem curvatura radicular e com ápice totalmente formado. Dentes bovinos que apresentavam reabsorção radicular ou trincas foram excluídos. Com antecedência de 96 horas antes do preparo para cada teste, os dentes foram descongelados e armazenados em água destilada a $4 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para evitar a desidratação.

3.4 Análise Morfológica

Na análise morfológica foram estudados os seguintes fatores: faixa etária da dentina (jovem e madura/adulta), origem da dentina (humana e bovina), tipo de dente bovino (primeiro incisivo, segundo incisivo, terceiro incisivo e canino) e terço radicular (cervical, médio e apical). As variáveis respostas foram: número, diâmetro e área dos túbulos dentinários.

Foram utilizados 12 dentes humanos e 36 bovinos divididos em oito grupos de acordo com a faixa etária, origem e tipo de dente bovino (n = 6) (FIGURA 01).

Figura 01- Divisão dos dentes segundo os fatores estudados na análise morfológica das dentinas radiculares humana e bovina.

Dentina	Humana		Bovina		
	Jovem	Unirradicular	Primeiro Incisivo	Segundo Incisivo	
Dentina	Humana		Bovina		
	Madura/Adulta	Unirradicular	Primeiro Incisivo	Segundo Incisivo	Terceiro Incisivo

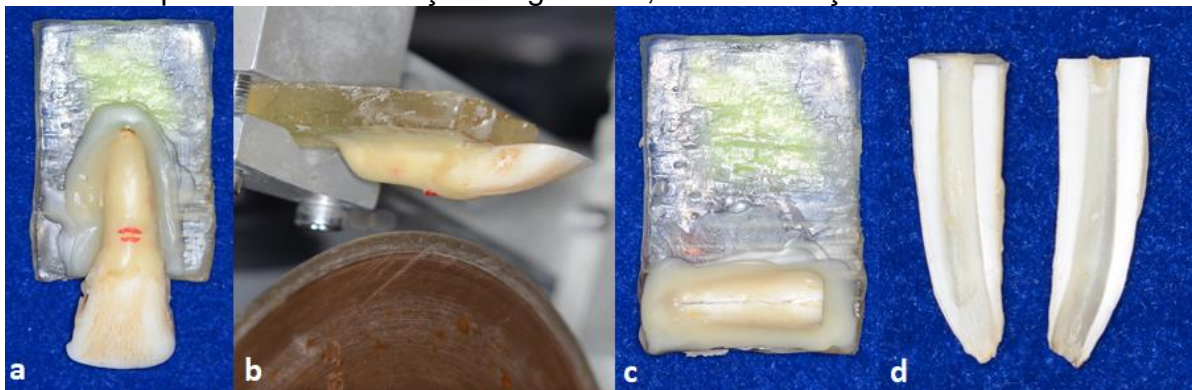
Fonte: Do autor, 2019.

3.4.1 Preparo dos Dentes

Os dentes foram seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos), com disco adiamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) sob refrigeração constante a água, para remoção da coroa. Os tecidos pulpaes radiculares foram removidos com lima #10 K-file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), sob irrigação com água deionizada. Posteriormente, as raízes foram fixadas em placas de acrílico com cera pegajosa, que foram acopladas em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos). Com auxílio de um disco adiamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) e refrigeração

constante a água, foi realizado um corte ao longo eixo do dente no sentido vestibulo-lingual para a obtenção de duas hemisecções (FIGURA 02).

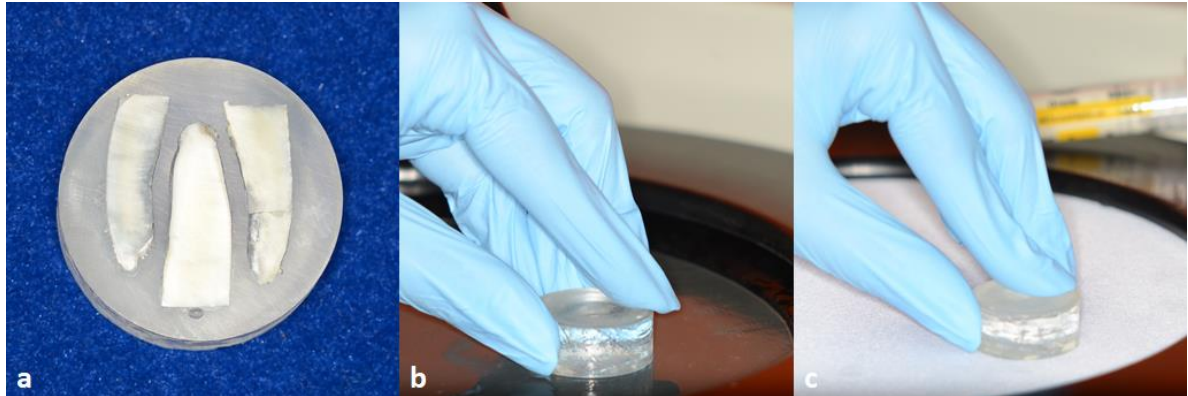
Figura 02 - Preparo dos espécimes. **a.** Dente bovino fixado na placa de acrílico, **b.** Dente sendo seccionado abaixo da junção amelocementária, **c.** Raiz fixada na placa de acrílico para realizar a secção longitudinal, **d.** Hemisecções da raiz.



Fonte: Do autor, 2019.

Uma hemisecção de cada raiz foi escolhida, aleatoriamente, e embutida em resina ortoftálica (Cristal 5061, Belo Horizonte, MG, Brasil), planificada e polida com lixas de carbureto de silício com granulações decrescentes #400, #600, #800, #1200, #1500, #2000 e #2500 (Norton, Guarulhos, SP, Brasil), em polidora metalográfica (APL-4, Arotec Indústria e Comércio, Cotia, SP, Brasil), sob irrigação com água deionizada. Para realização do polimento final, foram utilizados discos de feltro e pastas diamantadas com granulação decrescente de 1,0, 0,5 e 0,25 μm (Erios, São Paulo, SP, Brasil). A cada troca de lixa ou feltro os espécimes foram lavados com água deionizada e, então, receberam banhos em cuba ultrassônica por 15 minutos (Modelo Cd4820I, Kondentech Indústria e Comércio Ltda. São Carlos, SP, Brasil) para eliminação de resíduos superficiais (FIGURA 03).

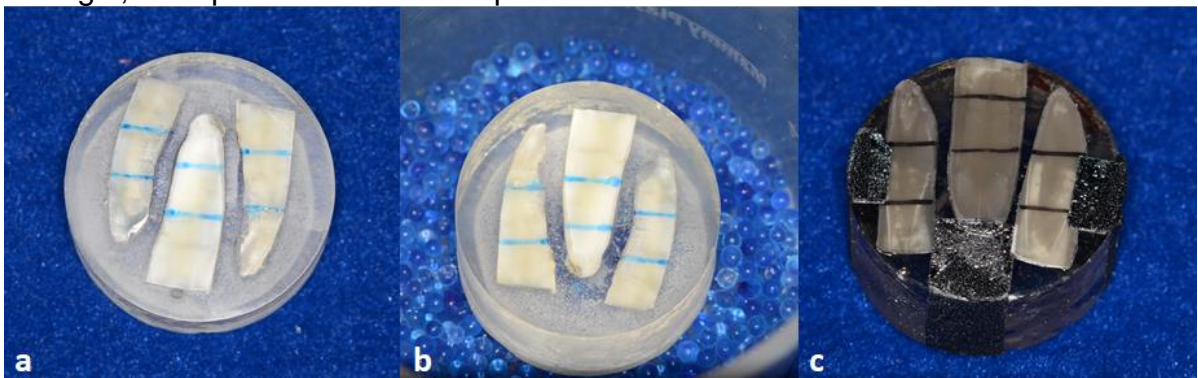
Figura 03 - **a.** Espécimes embutidos em resina ortoftálica, **b.** Polimento dos espécimes com lixa de carbureto de silício, **c.** Polimento dos espécimes com pastas diamantadas em disco de feltro.



Fonte: Do autor, 2019.

Os espécimes tiveram o seu comprimento total determinado com paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil) e delimitados os terços cervical, médio e apical. Ao final, os espécimes foram armazenados em recipiente hermeticamente fechado, contendo sílica gel, por pelo menos 24 horas antes da metalização. Em seguida, os espécimes foram fixados em *stubs* e revestidos por carbono (Sputtering, modelo Balzers SCD 050), com 15 nm de espessura, para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (FIGURA 04).

Figura 04 - **a.** Delimitação dos terços radiculares nos espécimes, **b.** Espécimes em sílica gel, **c.** Espécimes revestidos por carbono.



Fonte: Do autor, 2019.

3.4.2 Obtenção das Imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura

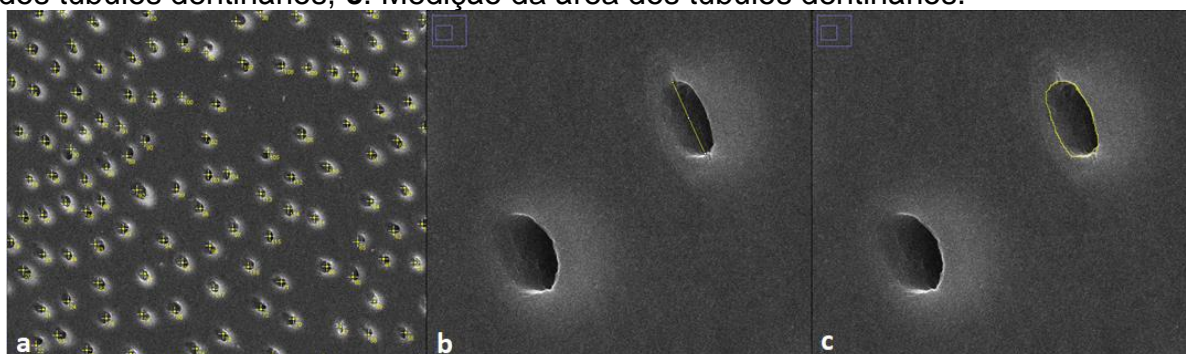
Foram obtidas imagens dos espécimes analisados em MEV (FEG – FEI, FEG Quanta 200F, Hillsboro, OR, EUA), com uma tensão de operação de 15 kV e

resolução de 2304 x 3072 *pixels*, a partir de três diferentes regiões em cada terço radicular.

Uma área total de 10.000 μm^2 (magnificação de 1.000X) foi definida para a contagem do número de túbulos dentinários e uma área total de 2.500 μm^2 (magnificação de 5.000X) foi definida para mensurar o diâmetro e área dos túbulos dentinários (CAMARGO *et al.*, 2007). As áreas de análise foram posicionadas em cada terço radicular de maneira aleatória, de acordo com sua altura e largura vestibulo-lingual.

As imagens obtidas foram analisadas por um único avaliador, usando o *software ImageJ 1.46* (NIH, Bethesda, Maryland, Estados Unidos), com magnificação padronizada de 35,4%. Para a análise do diâmetro e área dos túbulos dentinários, todos os túbulos dentinários presentes na área de análise foram medidos. A média dos diâmetros e áreas dos túbulos dentinários analisados em cada área de análise foi utilizada na análise dos dados (FIGURA 05).

Figura 05 - **a.** Contagem do número de túbulos dentinários, **b.** Medição do diâmetro dos túbulos dentinários, **c.** Medição da área dos túbulos dentinários.



Fonte: Do autor, 2019.

Antes das análises, o avaliador do estudo passou por uma calibração intraexaminador, onde 10% das imagens do estudo foram analisadas em dois momentos distintos, com intervalo de duas semanas. Foi calculado o grau de concordância intraexaminador baseado no Coeficiente Kappa (LANDIS; KOCH, 1977), obtendo-se graus de concordância de 0,89, 0,77 e 0,73 na análise do número, diâmetro e área dos túbulos dentinários, respectivamente.

3.5 Análise Química

A análise dos aspectos químicos das dentinas radiculares humanas e bovinas de diferentes faixas etárias foi feita por meio da Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia, Espectroscopia por Comprimento de Onda Dispersivo e Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier.

3.5.1 Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS) e Espectroscopia por Comprimento de Onda Dispersivo (WDS)

Foram estudados os seguintes fatores: faixa etária da dentina (jovem e madura/adulta), origem da dentina (humana ou bovina) e terço radicular (cervical, médio e apical). As variáveis respostas foram: conteúdo de Cálcio (Ca), Fósforo (P), Sódio (Na), Magnésio (Mg) e razão Ca/P. Foram utilizados 12 dentes humanos e 12 dentes bovinos, divididos em quatro grupos (n = 6) de acordo com a faixa etária e origem.

3.5.1.1 Preparo dos dentes

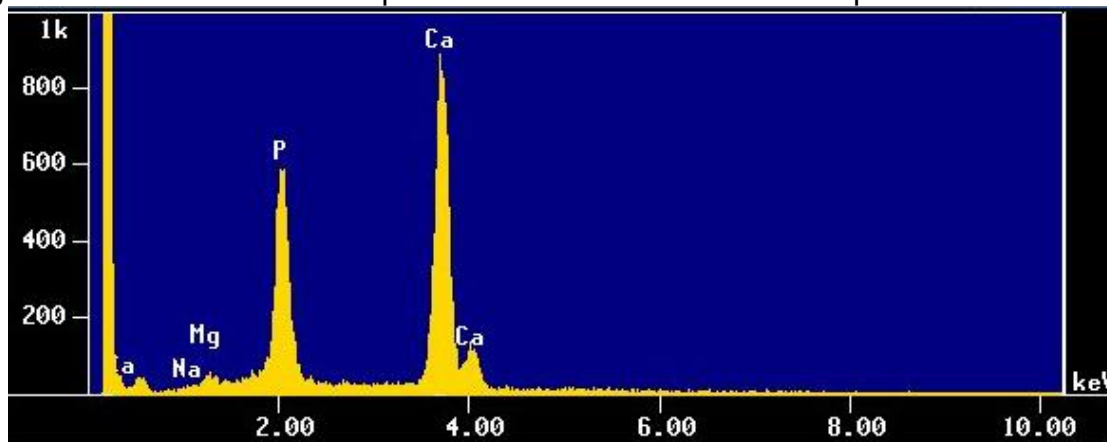
Na análise da composição mineral por EDS e WDS foram utilizados os mesmos dentes preparados para a análise morfológica por MEV. Para a definição dos dentes bovinos que seriam analisados dentre os 12 jovens e 24 adultos, os mesmos receberam uma numeração e selecionaram-se de forma aleatória seis dentes de mesma faixa etária e origem para comporem cada um dos quatro grupos.

3.5.1.2 Análise por EDS e WDS

Os espécimes foram analisados por microsonda eletrônica (Jeol JXA 8900 RL WD/ED Combined Microanalyzer), equipada com espectrômetros WDS e EDS.

Com o EDS foi realizado um mapeamento elementar da amostra em cinco diferentes pontos por terço radicular. A amostra foi irradiada por feixe de elétrons focado, com energia de 15 kV e tempo de 100 segundos por análise. Foi possível identificar a presença dos elementos químicos de interesse: Ca, P, Na e Mg (FIGURA 06).

Figura 06 - Resultados do mapeamento elemental da amostra por EDS.



Fonte: Do autor, 2019.

Após identificação dos elementos químicos, foi realizada a análise por WDS para quantificar (%) a composição elemental da amostra com base nesta identificação. Em cada terço radicular dos espécimes foram realizadas análises em cinco diferentes áreas, escolhidas aleatoriamente com uso de imagens de elétrons retroespalhados. A amostra foi irradiada com feixes de elétrons com tensão de aceleração de 15 kV, corrente da ordem de 20 nA, em tempo de aquisição no pico de 10 segundos e *background*, em ambos os lados, de 5 segundos. As análises foram realizadas com ampliações de 30.000X. Para a quantificação dos elementos foram utilizados como padrões: o mineral de jadeíta para o Na, o Óxido de Magnésio (MgO) para o Mg e o Pirofosfato de Cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) para o Ca e o P.

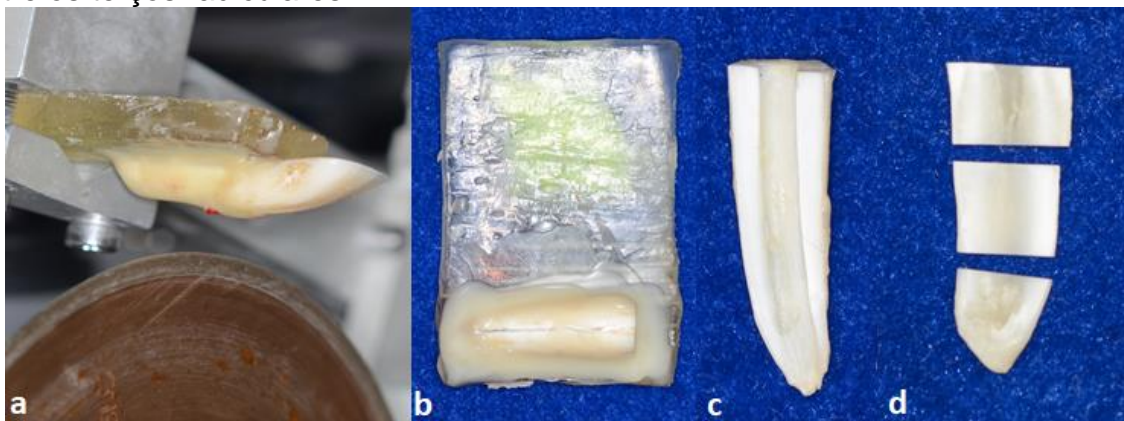
3.5.2 Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman)

Foram estudados os seguintes fatores: faixa etária da dentina (jovem e madura/adulta), origem da dentina (humana e bovina) e terço radicular (cervical, médio e apical). As variáveis respostas foram: concentração mineral relativa, gradiente em conteúdo mineral, cristalinidade e natureza do colágeno. Foram utilizados 12 dentes humanos e 12 dentes bovinos, divididos em quatro grupos (n = 6) de acordo com a faixa etária e origem.

3.5.2.1 Preparo dos dentes

Os dentes foram seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos), usando disco adiamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) sob refrigeração constante a água, para remoção da coroa. Os tecidos pulpares radiculares foram removidos com lima #10 K-file (Dentisply Maillefer, Ballaigues, Suíça), sob irrigação com água destilada. Posteriormente, as raízes foram fixadas em placas de acrílico com cera pegajosa, que foram acopladas em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos). Com auxílio de um disco adiamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) e refrigeração constante a água, foi realizado um corte ao longo eixo do dente no sentido vestibulo-lingual para a obtenção de duas hemisecções. Uma hemisecção de cada raiz foi selecionada, aleatoriamente, e seu comprimento total foi determinado com paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil). Cortes transversais foram realizados nos limites entre os terços radiculares (FIGURA 07).

Figura 07 - **a.** Dente posicionado na cortadeira metalográfica de precisão para o corte abaixo da junção amelocementária, **b.** Raiz fixada na placa de acrílico para a realização da secção longitudinal, **c.** Hemisecção da raiz, **d.** Hemisecção seccionada entre os terços radiculares.

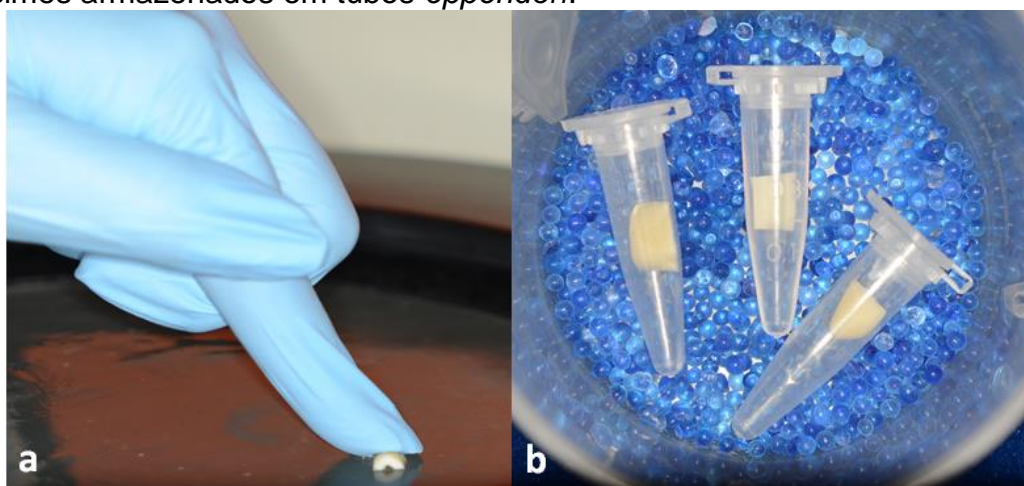


Fonte: Do autor, 2019.

Os espécimes foram polidos com lixas de carbureto de silício com granulações de #600 e #800 (Norton, Guarulhos, SP, Brasil) em polidora metalográfica (APL-4, Arotec Indústria e Comércio, Cotia, SP, Brasil), sob irrigação com água deionizada. Entre o uso das lixas e ao final do polimento, os espécimes

foram lavados com água deionizada e receberam banhos em cuba ultrassônica (Modelo Cd4820I, Kondentech Indústria e Comércio Ltda. São Carlos, SP, Brasil) para eliminação de resíduos superficiais (FIGURA 08).

Figura 08 - **a.** Polimentos dos espécimes com lixas de carbureto de silício, **b.** Espécimes armazenados em tubos *ependorf*.

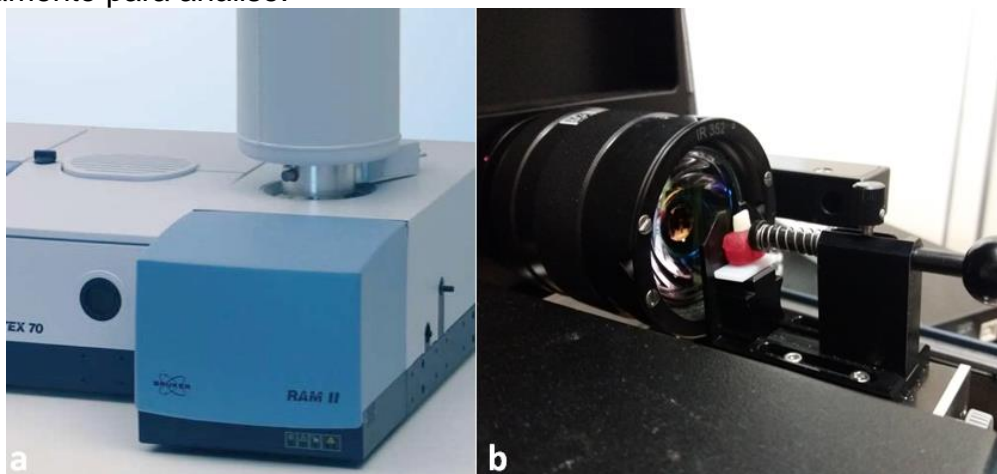


Fonte: Do autor, 2019.

3.5.2.2 Análise por FT-Raman

Foi utilizado equipamento para medidas Raman (módulo RAM II FT-Raman, Vertex 70, Bruker, Ettlingen, Alemanha), no Laboratório de Espectroscopia Raman, do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. Este equipamento possui detector (CCD) de germânio resfriado por nitrogênio líquido. Foi utilizado o laser Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) a 1064 nm. Inicialmente foram realizados testes para a definição da potência de trabalho, quantidade de varreduras e acumulações de espectros necessários para otimizar a relação sinal/ruído. Em cada um dos espécimes foram obtidos três espectros, com 150 mW de potência do laser, resolução de 4 cm^{-1} para 250 acumulações em número de onda de 35 a 3.596 cm^{-1} (FIGURA 09).

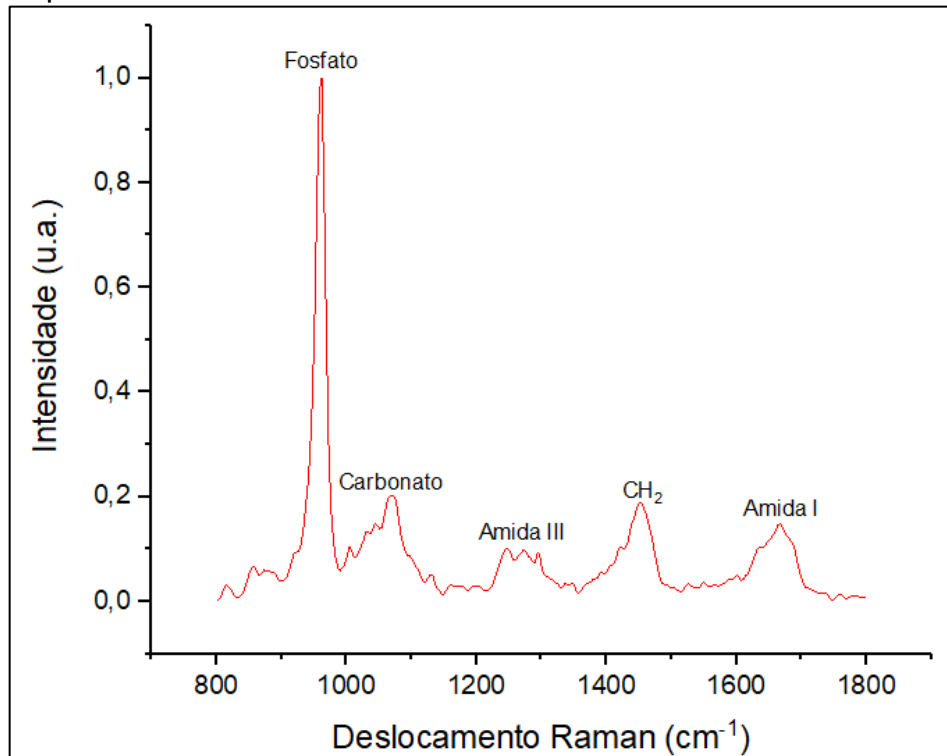
Figura 09 - **a.** Equipamento Raman utilizado, **b.** Espécime posicionado no equipamento para análise.



Fonte: Do autor, 2019.

O *software* OriginPro 7,5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, Estados Unidos) foi utilizado para analisar os espectros obtidos. Os espectros foram ajustados por correção de linha de base de múltiplos pontos e o pico de vibração ν_1 do fosfato a 960 cm^{-1} foi selecionado como padrão interno para normalização. O pico a 1070 cm^{-1} foi atribuído à vibração ν_1 do grupo carbonato e o pico a 960 cm^{-1} à vibração ν_1 do grupo fosfato na hidroxiapatita. Os picos em $1246/1270$, 1450 e $1655/1667\text{ cm}^{-1}$ correspondem à amida III, CH_2 e amida I, respectivamente, e foram utilizados para identificar a conformação molecular das cadeias polipeptídicas (JASTRZEBSKA *et al.*, 2003; XU & WANG, 2011) (FIGURA 10).

Figura 10. Exemplo de um espectro obtido com a identificação dos picos estudados na análise química.



Fonte: Do autor, 2019.

Com base nos dados espectrais Raman, analisou-se:

- Concentração mineral relativa: proporção do fosfato 960 cm^{-1} (PO_4^{3-} ν_1) para amida I, para analisar as diferenças na razão mineral/matriz, esta razão refere-se ao grau máximo relativo de mineralização.
- Gradiente em conteúdo mineral: Foi avaliado como a relação entre a razão de alturas de 1070 cm^{-1} (carbonato) (CO_3^{2-}) a 960 cm^{-1} (fosfato) (PO_4^{3-}), indicando a substituição de carbonato por fosfato (SCHWARTZ *et al.*, 2012).
- Cristalinidade: larguras das bandas de fosfato a 960 cm^{-1} e de carbonato a 1.070 cm^{-1} , dadas pela largura à meia altura (*FWHM*), foram obtidas em cada espectro para representar o grau de cristalinidade da dentina (PUCÉAT *et al.*, 2004; TOLEDANO *et al.*, 2015). Estes índices expressam a ordem cristalográfica ou atômica relativa, uma vez que picos mais estreitos sugerem menor variação estrutural nas distâncias e ângulos de ligação (SCHWARTZ *et al.*, 2012). Em geral, quanto mais estreita a largura do pico espectral, maior o grau de cristalinidade mineral (KARAN *et al.*, 2009).

- d) Natureza do colágeno: foram calculadas as razões amida I/amida III que diz respeito à organização do colágeno, e amida I/CH₂ que indica alteração na qualidade do colágeno (SALEHI *et al.*, 2013; TOLEDANO *et al.*, 2015).

3.6 Análise Física

A análise dos aspectos físicos das dentinas radiculares humanas e bovinas de diferentes faixas etárias foi feita por meio do teste de nanoindentação, ensaio de resistência à flexão em três pontos, ensaio de compressão e teste de resistência ao cisalhamento por extrusão (*push-out*) de pinos de fibra de vidro fixados com cimentos resinosos. Adicionalmente, avaliou-se o grau de conversão dos cimentos resinosos utilizados.

3.6.1 Teste de Nanoindentação

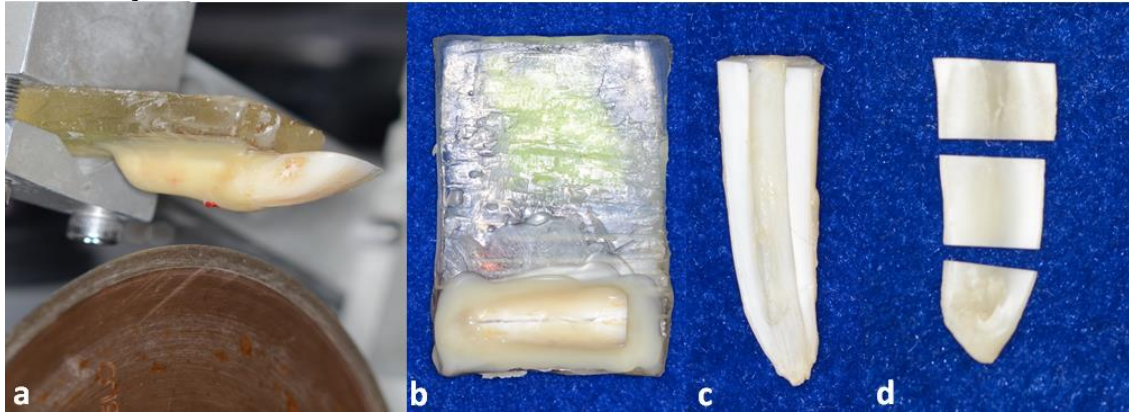
Foram estudados os seguintes fatores: faixa etária da dentina (jovem e madura/adulta), origem da dentina (humana e bovina) e terço radicular (cervical, médio e apical). As variáveis respostas foram: nanodureza e módulo de elasticidade. Foram utilizados 12 dentes humanos e 12 dentes bovinos, divididos em quatro grupos (n = 6) de acordo com a faixa etária e origem.

3.6.1.1 Preparo dos dentes

Os dentes foram seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos), com disco adiamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) sob refrigeração constante a água, para remoção da coroa. Os tecidos pulpares radiculares foram removidos com lima #10 K-file (Dentisply Maillefer, Ballaigues, Suíça), sob irrigação com água destilada. Posteriormente, as raízes foram fixadas em placas de acrílico com cera pegajosa, que foram acopladas em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos). Com auxílio de um disco adiamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) e refrigeração constante a água, foi realizado um corte ao longo eixo do dente no sentido vestibulo-lingual para a obtenção de duas hemisecções. Uma hemisecção de cada raiz foi selecionada, aleatoriamente, e seu comprimento total foi

determinado com paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil). Cortes transversais foram realizados nos limites entre os terços radiculares (FIGURA 11).

Figura 11 - **a.** Dente posicionado na cortadeira metalográfica de precisão para o corte abaixo da junção amelocementária, **b.** Raiz fixada na placa de acrílico para a realização da secção longitudinal, **c.** Hemisecção da raiz, **d.** Hemisecção seccionada entre os terços radiculares.



Fonte: Do autor, 2019.

Cada espécime foi embutido em resina ortoftálica (Cristal 5061, Belo Horizonte, MG, Brasil), planificado e polido com lixas de carbureto de silício com granulações decrescentes #600, #800, #1200, #1500, #2000 e #2500 (Norton, Guarulhos, SP, Brasil), em polidora metalográfica (APL-4, Arotec Indústria e Comércio, Cotia, SP, Brasil), sob irrigação com água destilada. Para realização do polimento final, foram utilizados discos de feltro e pastas diamantadas com granulação decrescente de 1,0, 0,5 e 0,25 μm (Erios, São Paulo, SP, Brasil). A cada troca de lixa ou feltro as amostras foram lavadas com água destilada e, então, receberam banhos em cuba ultrassônica (Modelo Cd4820I, Kondentech Indústria e Comércio Ltda. São Carlos, SP, Brasil), por 15 minutos, para eliminação de resíduos superficiais (FIGURA 12).

Figura 12 - **a.** Espécimes embutidos em resina ortoftálica, **b.** Polimento do espécime com lixas de carbureto de silício, **c.** Polimento do espécime com discos de feltro e pastas diamantadas.



Fonte: Do autor, 2019.

3.6.1.2 Análise da dureza e do módulo de elasticidade

Foi utilizado Microscópio de Força Atômica (AFM) (MFP-3D-AS, Asylum Research, Santa Barbara, CA, EUA), com penetrador de diamante Berkovich (Hysitron Inc., Minneapolis, MN, EUA), com o espécime hidratado. Foram selecionadas 3 áreas de análises em cada espécime para a realização de 16 indentações, a uma distância mínima de 10 μm entre cada uma, para evitar a sobreposição de áreas vizinhas, em uma área 50 X 50 μm^2 . A carga empregada pelo AFM foi de 2.000 μN , mantida por 5 segundos, com carga/descarga de 10 segundos cada (XU *et al.*, 2014). Os valores de dureza e módulo de elasticidade à nanoindentação foram calculados utilizando o modelo de Oliver & Pharr (1992) a partir das curvas de força versus penetração, ambos em Gigapascal (GPa).

3.6.2 Ensaio de Resistência à Flexão em Três Pontos

Foram estudados os seguintes fatores: faixa etária da dentina (jovem e madura/adulta) e origem da dentina (humana e bovina). As variáveis respostas foram: resistência à flexão e módulo de elasticidade à flexão. Foram utilizados 12 dentes humanos e 12 dentes bovinos, divididos em quatro grupos ($n = 6$) de acordo com a faixa etária e origem.

3.6.2.1 Preparo dos dentes

Os dentes foram seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos), com disco adiamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) sob refrigeração constante a água, para remoção da coroa. Os tecidos pulpaes

radiculares foram removidos com lima #10 K-file (Dentisply Maillefer, Ballaigues, Suíça), sob irrigação com água destilada. Posteriormente, as raízes foram fixadas em placas de acrílico com cera pegajosa, que foram acopladas em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos). Com auxílio de disco adiantado (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) e refrigeração constante a água, foi realizado um primeiro corte ao longo eixo do dente no sentido vestibulo-lingual para a obtenção de duas hemisecções. Um segundo corte, paralelo ao primeiro, com uma distância de 1,5 mm, foi realizado para a obtenção de um espécime de dentina descartando a parte convexa da raiz (FIGURA 13).

Figura 13 - **a.** Dente fixado em placa de acrílico com cera pegajosa, **b.** Remoção da coroa com disco adiantado em cortadeira metalográfica, **c.** Raiz após a realização dos dois cortes paralelos ao longo eixo da raiz.



Fonte: Do autor, 2019.

Por fim, o espécime obtido foi fixado em placa de acrílico para realização de outros cortes conferindo-lhe um formato de barra (1 mm de espessura x 1 mm de largura x 10 mm de comprimento), envolvendo os terços cervical e médio (CULLEN *et al.*, 2015). As barras foram manualmente desgastadas, quando necessário, para atingir as dimensões indicadas, planificadas e polidas com lixas de carbureto de silício com granulações decrescentes #600, #1000 e #1200 (Norton, Guarulhos, SP, Brasil), em polidora metalográfica (APL-4, Arotec Indústria e Comércio, Cotia, SP, Brasil), sob irrigação com água destilada (FIGURA 14).

Figura 14 - **a.** Espécime obtido fixado em placa de acrílico para realização de outros cortes conferindo-lhe um formato de barra, **b.** Espécime após os cortes, **c.** Duas barras de dentina (1 mm x 1 mm x 10 mm).



Fonte: Do autor, 2019.

3.6.2.2 Análise da resistência à flexão e módulo de elasticidade à flexão

As barras foram mantidas em solução salina por uma semana até o teste, analisadas em estereomicroscópio (Zeiss, Jena, Oberkochen, Alemanha) para detecção de trincas ou defeitos, e submetidas ao teste de flexão em três pontos em máquina universal de ensaios (EZ-LX Long-Stroke Model, Shimadzu, Quioto, Japão), com uma célula de carga de 5N e velocidade de 0,25 mm/min, até a fratura (CULLEN *et al.*, 2015) (FIGURA 15).

Figura 15 - **a.** Espécime de dentina mantido em solução salina, **b.** Espécime posicionado na máquina universal de ensaios, **c.** Espécime em teste de flexão em três pontos.



Fonte: Do autor, 2019.

A resistência à flexão e o módulo de elasticidade à flexão foram calculados em Megapascal (MPa) e GPa, respectivamente, pelas fórmulas $\sigma_f = 3Fl/2bh^2$ e $E_f = Fl^2/4bh^3d \times 10^{-3}$, onde F é a força aplicada em newtons, L é a distância entre os pontos de apoio (8 mm), b é a largura (mm), h a espessura (mm) e d deflexão (mm).

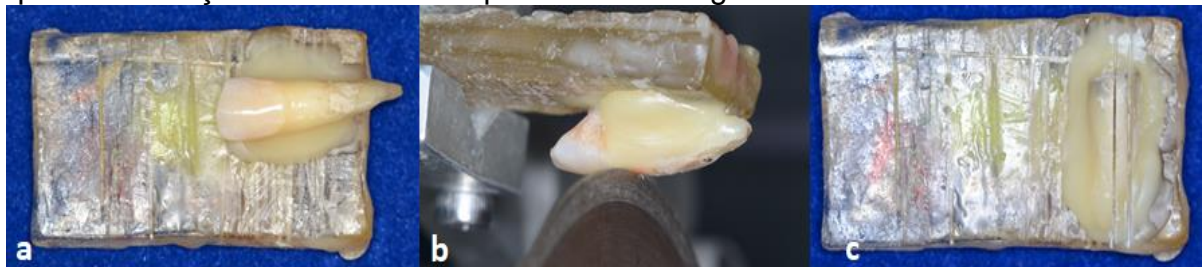
3.6.3 Ensaio de Compressão

Foram estudados os seguintes fatores: faixa etária da dentina (jovem e madura/adulta), origem da dentina (humana e bovina) e terço radicular (cervical, médio e apical). As variáveis respostas foram: resistência à compressão e módulo de elasticidade à compressão. Foram utilizados 12 dentes humanos e 12 dentes bovinos, divididos em quatro grupos ($n = 6$) de acordo com a faixa etária e origem.

3.6.3.1 Preparo dos dentes

Os dentes foram seccionados 1 mm abaixo da junção amelocementária em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos), com um disco adiamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) sob refrigeração constante a água, para remoção da coroa. Os tecidos pulparez radiculares foram removidos com lima #10 K-file (Dentisply Maillefer, Ballaigues, Suíça), sob irrigação com água destilada. Posteriormente, as raízes foram fixadas em placas de acrílico com cera pegajosa, que foram acopladas em cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos). Com auxílio de um disco adiamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos) e refrigeração constante a água, foi realizado um primeiro corte ao longo eixo do dente no sentido vestibulo-lingual para a obtenção de duas hemiseções. Um segundo corte, paralelo ao primeiro, com uma distância de 2,5 mm, foi realizado para a obtenção de um espécime de dentina descartando a parte convexa da raiz (FIGURA16).

Figura 16 - **a.** Remoção da coroa com disco adiamantado em cortadeira metalográfica, **b.** Raiz após a remoção da coroa fixada em placa de acrílico, **c.** Raiz após a realização dos dois cortes paralelos ao longo eixo da raiz.



Fonte: Do autor, 2019.

Por fim, o espécime de dentina obtido foi fixado em placa de acrílico e outros cortes foram realizados para a obtenção de dois espécimes em cada terço radicular com formato cuboide (0,7 mm de espessura X 2 mm de largura X 2 mm de comprimento) (ZAYTSEV *et al.*, 2015). Os espécimes foram manualmente desgastados, quando necessário, para atingir as dimensões indicadas, planificados e polidos com lixas de carbureto de silício com granulações decrescentes #600, #1000 e #1200 (Norton, Guarulhos, SP, Brasil), em polidora metalográfica (APL-4, Arotec Indústria e Comércio, Cotia, SP, Brasil), sob irrigação com água destilada. Ao final, os espécimes receberam banhos em cuba ultrassônica (Modelo Cd4820I, Kondentech Indústria e Comércio Ltda. São Carlos, SP, Brasil) para eliminação de resíduos superficiais (FIGURA 17).

Figura 17 - **a.** Espécime de dentina fixado em placa de acrílico com dois cortes paralelos ao seu longo eixo, **b.** Espécime de dentina em forma de barra com as demarcações para a obtenção dos corpos de prova, **c.** Espécimes de dentina em formato cuboide obtidos após os cortes.

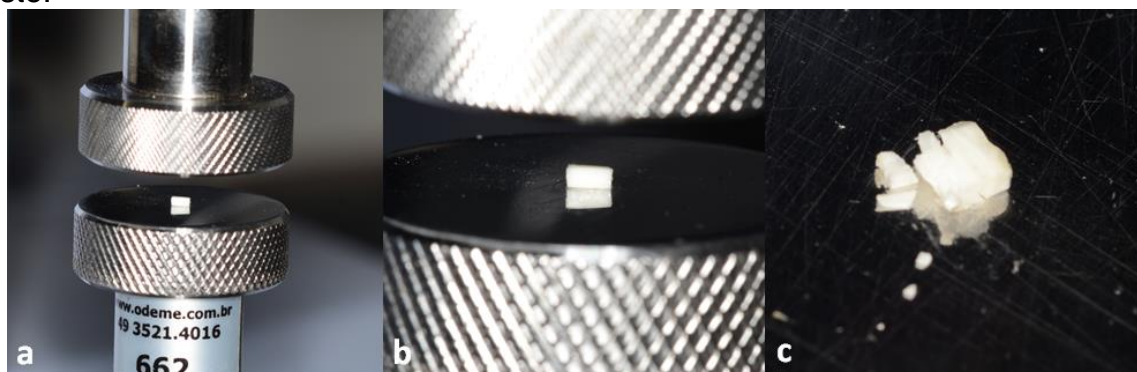


Fonte: Do autor, 2019.

3.6.3.2 Análise da resistência à compressão e módulo de elasticidade

O ensaio de compressão uniaxial foi executado em máquina universal de ensaios (EZ-LX Long-Stroke Model, Shimadzu, Quioto, Japão), com uma célula de carga de 5N e velocidade de 0,01 mm/min, até a fratura (FIGURA 18).

Figura 18 - **a.** Espécime posicionado entre os dispositivos para a realização do teste de compressão uniaxial, **b.** Espécime em teste de compressão, **c.** Espécime após o teste.



Fonte: Do autor, 2019.

A resistência à compressão (MPa) foi definida como a tensão máxima na curva de deformação (N/mm^2). O módulo de elasticidade à compressão (GPa) foi calculado na região elástica do diagrama tensão-deformação, pela seguinte fórmula: $E = \sigma/\epsilon$. Em que, $\sigma = F/A$ [σ = tensão; F = Força máxima aplicada (N); A = área da seção transversal do corpo de prova (mm^2)] e $\epsilon = \Delta l/l_0$ [ϵ = deformação uniaxial elástica; Δl = deslocamento na região de deformação elástica (mm); l_0 = comprimento inicial do corpo de prova (mm)].

3.6.4 Teste de Resistência ao Cisalhamento por Extrusão

O teste de resistência ao cisalhamento por extrusão foi realizado de acordo com um desenho em blocos completos aleatorizados, tendo como fatores em estudo: faixa etária da dentina (jovem e madura/adulta), origem da dentina (bovina e humana), cimento resinoso (*RelyX Ultimate*, dual convencional, e *RelyX U200*, dual autoadesivo) e terços radiculares (cervical, médio e apical). As variáveis respostas foram: resistência de união, padrão de falha na área de união e qualidade da linha de cimentação.

3.6.4.1 Cálculo amostral

A determinação do tamanho amostral foi baseada na magnitude padronizada de efeito (MPE), a partir de dados de um estudo anterior (GALHANO *et al.*, 2009). A MPE é definida como o quociente entre a magnitude de efeito e o desvio-padrão da variável de desfecho ($\text{MPE} = \text{magnitude de efeito} \div \text{desvio-padrão}$). Quanto maior a

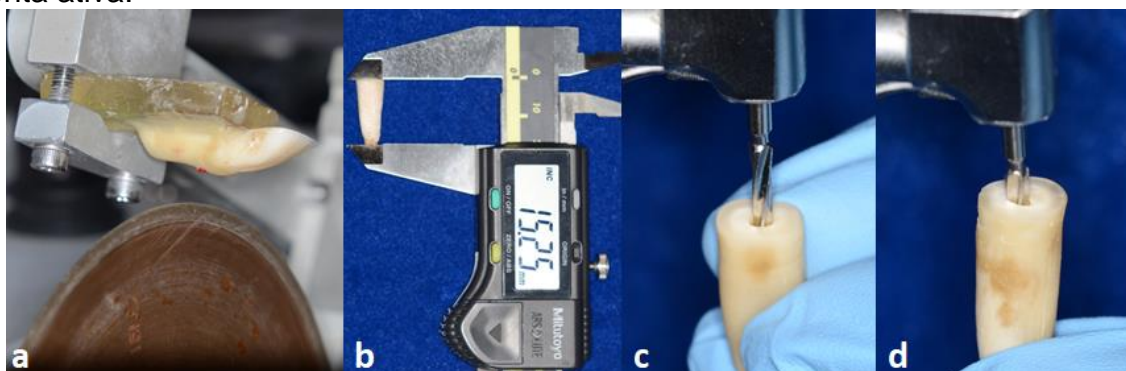
MPE, menor o tamanho de amostra necessário. Em vista disto, utilizou-se a fórmula simplificada de Browner, Newman & Hulley (2008), em que o tamanho da amostra = $16 \div MPE^2$. Considerando o poder do teste de 0,80 ($\beta = 0,2$) e o α (bilateral) como 0,05.

Os resultados do estudo de Galhano *et al.* (2009) foram considerados para o cálculo: resistência de união de dentes humanos ($8,6 \pm 5,7$) e resistência de união de dentes bovinos ($4,1 \pm 1,3$). O cálculo indicou um tamanho amostral de 10 dentes de cada origem e faixa etária, por grupo. Esta foi acrescida de 20% para compensar possíveis perdas, chegando a uma amostra final de 12 dentes.

3.6.4.2 Preparo dos dentes

A fim de verificar a conformação do conduto radicular e presença de apenas um canal radicular previamente ao corte, os dentes foram radiografados. Em seguida, os dentes foram fixados em placas de acrílico com cera pegajosa e seccionados abaixo da junção amelocementária para remoção da coroa, em cortadeira metalográfica de precisão (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, Estados Unidos). As raízes tiveram um comprimento uniforme de 15 mm, verificado por paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil). Para padronizar o diâmetro do conduto, foram selecionadas raízes nas quais fosse possível penetrar até 1/3 da ponta ativa da broca Whitepost DC3 (FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) (FIGURA 19).

Figura 19 - **a.** Dente fixado na placa de acrílico e sendo seccionado abaixo da junção amelocementária em cortadeira metalográfica, **b.** Padronização do comprimento das raízes, **c.** Padronização do diâmetro do conduto, **d.** Exemplo de raiz que foi descartada por apresentar um conduto onde a broca penetrasse mais que 1/3 da ponta ativa.



Fonte: Do autor, 2019.

3.6.4.3 Tratamento endodôntico das raízes

Os tecidos pulpares remanescentes foram removidos dos canais radiculares com lima #10 K-file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Os canais foram preparados e modelados com instrumentos rotatórios de níquel-titânio, Sistema Protaper Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), usando o equipamento X-Smart Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), com torque a 3,5 N e velocidade de 350 rpm. Entre cada instrumento utilizado, os canais foram irrigados com 5 ml de hipoclorito de sódio a 2.5% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil). Solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) foi utilizada para irrigação final antes da obturação, para limpeza do conduto. Os canais foram obturados com guta-percha (Odous, Belo Horizonte, MG, Brasil) e cimento à base de resina epóxica (AH Plus, Dentsply, Petrópolis, Brasil), usando a técnica de condensação lateral. Foi realizada uma radiográfica final com o propósito de certificar a qualidade final da obturação. Em seguida, os espécimes foram armazenados em umidade a 37 °C por 7 dias.

3.6.4.4 Preparo radicular para cimentação dos pinos

As raízes foram identificadas (origem/faixa etária) e por aleatorização foram distribuídas de acordo com o protocolo de cimentação dos pinos de fibra de vidro que seriam submetidas.

Para o preparo do conduto radicular, a guta percha foi removida do interior do conduto, mantendo-se 4 mm de guta percha na região apical, garantindo o selamento da obturação endodôntica e o comprimento de trabalho de 11 mm. Os condutos foram preparados com a broca Whitepost DC3 (FGM Produtos Odontológicos, Joinvile, Brasil), adequando o preparo ao formato do pino de fibra de vidro Whitepost DC3 (FGM Produtos Odontológicos, Joinvile, Brasil).

3.6.4.5 Protocolos de cimentação

Para cimentação dos pinos de fibra de vidro de vidro Whitepost DC3 (FGM Produtos Odontológicos, Joinvile, Brasil) foram utilizados os cimentos resinosos *RelyX Ultimate* (3M ESPE, St. Paul, MN, Estados Unidos) e *RelyX U200* (3M ESPE, St. Paul, MN, Estados Unidos) (QUADRO 01).

Quadro 01 - Materiais utilizados na cimentação dos pinos de fibra de vidros e suas composições.

Material (Fabricante)	Composição
<i>RelyX Ultimate</i> (3M ESPE, st. Paul, MN, EUA)	Pó de vidro (65997-17-3), superfície modificada com 2-propenóico, 2 metil-.3-(trimetoxissilil) propílico (2530-85-0) e feniltrimetoxi silano (2996-92-1); 2-Propanóico, 2-Metil-, 1,1 '- [1-(Hidroximetil) -1,2-Etanodiilo] Ester, Produtos da reação com 2-Hidroxi-1,3-Propanodiilo-dimetacrilato e Óxido de Fósforo; Dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA); Sílica tratada de silano; Óxidos de vidro químico (não fibrosos); Persulfato de sódio; Terc-butil 3,5,5-trimetil peroxihexanoato; Ácido acético, sia de cobre (2+) monohidratado.
<i>RelyX U200</i> (3M ESPE, st. Paul, MN, EUA)	Pó de vidro (65997-17-3), superfície modificada com 2-propenóico, 2 metil-.3-(trimetoxissilil) propílico (2530-85-0); Dimetacrilato substituída; P-Toluenosulfonato de sódio; 1,12-Dodecano dimetacrilato; Sílica tratada de silano; 2,4,6(1H,3H,5H)Pirimidinetriona, 5-fenil-1-(fenilmetil) sal de cálcio (2:1); Hidróxido de cálcio; Ácido 2-propanóico, 2-metil[(3-metoxipropil)imino]di-2,1-etanodiil éster; Amina metacrilada; Dióxido de titânio.
<i>RelyX Ceramic Primer</i> (3M ESPE, st. Paul, MN, EUA)	Álcool etílico; Água; Metacrilato de 3-Trimetoxissililpropilo.
<i>Single Bond Universal</i> (3M ESPE, st. Paul, MN, EUA)	Metacrilato de 2-hidroxietila; Bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato; (BisGMA) Decametileno dimetacrilato; Etanol; Sílica tratada de silano; Água; 1,10-Decanodiol fosfato metacrilato; Copolímero de acrílico e ácido itacônico; Caforquinona; N,N-Dimetilbenzocaína.

Os protocolos de cimentação foram definidos de acordo com as recomendações do fabricante dos cimentos resinosos utilizados (QUADRO 02).

Quadro 02 - Descrição do protocolo de cimentação dos pinos de fibra de vidro de acordo com o cimento resinoso utilizado.

Cimento resinoso <i>RelyX Ultimate</i>	
a)	Prova do pino para a avaliação da adaptação e demarcação do seu correto posicionamento.
b)	Revestimento externo das raízes com fita adesiva preta para controle do acesso de luz.
c)	Limpeza do pino com álcool 70% de forma ativa, por 15 segundos, e secagem com jatos de ar.
d)	Aplicação do silano de forma ativa por 60 segundos.
e)	Aplicação de duas camadas do <i>Single Bond Universal</i> no pino, por 20 segundos, de maneira ativa com o <i>microbrush</i> , seguida por leve jato de ar por 5 segundos.
f)	Limpeza do conduto radicular removendo vestígios de cimento endodôntico com hipoclorito de sódio a 2,5%, por 60 segundos. Lavagem com água destilada em abundância e secagem com pontas de papel absorvente.
g)	Aplicação de uma camada de <i>Single Bond Universal</i> no conduto radicular, de forma ativa por 20 segundos. Remoção do excesso de adesivo com pontas de papel e leve aplicação jato de ar por 5 segundos.
h)	Dispensa das pastas do cimento resinoso em bloco de mistura, espatulação das pastas por 10 segundos e aplicação no conduto radicular utilizando ponta aplicadora da seringa Centrix.
i)	Inserção do pino no conduto radicular, girando.
j)	Fotoativação com irradiância de 1350 mW/cm ² , comprimento de onda de 440-480 nm, (Ratii Plus, SDI Limited, Bayswater, Victoria, Austrália) por 20 segundos em cada face (vestibular e lingual).
Cimento resinoso <i>RelyX U200</i>	
a)	Prova do pino para a avaliação da adaptação e demarcação do seu correto posicionamento.
b)	Revestimento externo das raízes com fita adesiva preta para controle do acesso de luz.
c)	Limpeza do pino com álcool 70% de forma ativa, por 15 segundos, e secagem com jatos de ar.
d)	Aplicação do silano de forma ativa por 60 segundos.
e)	Limpeza do conduto radicular removendo vestígios de cimento endodôntico com hipoclorito de sódio a 2,5%, por 60 segundos. Lavagem com água destilada em abundância e secagem utilizando pontas de papel absorvente.
f)	Dispensa das pastas do cimento resinoso em bloco de mistura, espatulação das pastas por 10 segundos e aplicação no conduto radicular utilizando ponta aplicadora da seringa Centrix.
g)	Inserção do pino no conduto radicular, girando.
h)	Fotoativação com irradiância de 1350 mW/cm ² , comprimento de onda de 440-480 nm, (Ratii Plus, SDI Limited, Bayswater, Victoria, Austrália) por 20 segundos em cada face (vestibular e lingual).

3.6.4.6 Obtenção dos espécimes e teste de resistência ao cisalhamento por extrusão

Após o armazenamento em meio úmido a 37 °C por 24 horas, as raízes foram seccionadas perpendicularmente ao seu longo eixo, em cortadeira metalográfica de precisão (Isomet, Büehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos), para obtenção de dois espécimes com espessura de aproximadamente 1 mm em cada terço radicular. Antes da obtenção dos espécimes, a primeira secção na porção mais cervical da raiz, com espessura de aproximadamente 0,5 mm, foi descartada. O objetivo de eliminar esta fatia se dá pelo risco da não polimerização completa do cimento resinoso na presença do oxigênio (DALEPRANE *et al.*,2016) (FIGURA 20).

Figura 20 - **a.** Raiz com pino de fibra de vidro cimentado fixada na placa de acrílico para o corte, **b.** Raiz sendo seccionada perpendicularmente ao seu longo eixo, **c.** Raiz com as várias secções.



Fonte: Do autor, 2019.

A espessura dos espécimes foi verificada com um paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil), com precisão de duas casas decimais. Cada espécime foi posicionado sobre uma base metálica com orifício central de 2 mm de diâmetro, com a face coronal para baixo. Um êmbolo com extremidade de 1 mm de diâmetro foi adaptado à máquina universal de ensaios (EZ-LX Long-Stroke Model, Shimadzu, Quioto, Japão) e posicionado sobre o espécime, de forma a tocar somente o pino, sem entrar em contato com as paredes do conduto radicular. O ensaio foi conduzido com uma célula de carga de 5N, a uma velocidade de 0,5 mm/min, até que ocorresse o deslocamento do pino no interior do conduto radicular e a força máxima necessária para este deslocamento fosse registrada pelo *software* TRAPEZIUM X (Shimadzu, Quioto, Japão) (FIGURA 21).

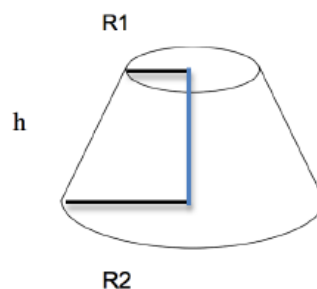
Figura 21 - **a.** Espécimes obtidos em cada terço radicular, **b.** Verificação da espessura do espécime, **c.** Espécime posicionado sobre a base metálica para ser submetido ao teste, **d.** Espécime com deslocamento do pino após teste.



Fonte: Do autor, 2019.

Para obtenção da resistência de união em MPa, a força obtida em Newtons foi dividida pela área da interface adesiva. Como o fragmento do pino tem o formato cônico (Figura 14), os diâmetros dos pinos, em cada superfície do espécime, foram medidos com o microscópio comparador digital (MOD TM 505, Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil) e a espessura dos espécimes foi medida utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil) e a área total, em mm², da interface adesiva foi calculada aplicando-se a fórmula: $A = \pi(R_2 + R_1) [h^2 + (R_2 - R_1)^2]^{0.5}$ Onde: $\pi = 3,14$; R_2 = raio coronal do fragmento de pino (raio maior); R_1 = raio apical do fragmento de pino (raio menor); e h = espessura do espécime (FIGURA 22).

Figura 22 - Representação esquemática do formato cônico do fragmento do pino.



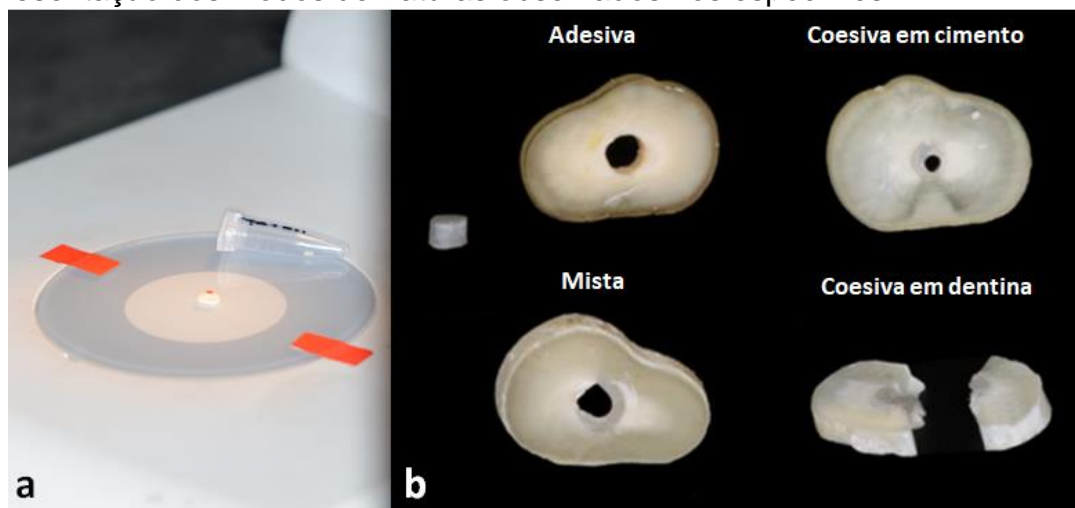
Fonte: Do autor, 2019.

3.6.4.7 Análise do padrão de fratura

Após o teste, cada espécime foi observado em estereomicroscópio (Zeiss, Jena, Oberkochen, Alemanha), com aumento de 40X, para determinar o padrão de

fratura que foi classificado como: Adesiva; Coesiva em cimento; Coesiva em dentina; e Mista (FIGURA 23).

Figura 23 - **a.** Espécimes fraturados sendo analisados em estereomicroscópio, **b.** Representação dos modos de fraturas observados nos espécimes.



Fonte: Do autor, 2019.

3.6.4.8 Avaliação da qualidade da linha de cimentação

Espécimes representativos de cada condição experimental foram selecionados para avaliação da qualidade da linha de cimentação em MEV. Os espécimes foram embutidos em resina ortoftálica (Cristal 5061, Belo Horizonte, MG, Brasil), polidas com lixas de carbureto de silício de granulações #600, #800, #1200, #2000 e #2500 (Norton, Guarulhos, SP, Brasil) em polidora metalográfica (APL-4 Arotec, Cotia, SP, Brasil), sob irrigação com água (PEREIRA *et al.*, 2015).

A superfície dos espécimes foi desmineralizada com ácido fosfórico 50% por 3 segundos, seguido de enxágue em água corrente por 1 minuto e desproteinização por imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 10 minutos. Então, foram lavadas três vezes com água destilada e imersas em soluções de concentração crescente de etanol (25, 50, 75, 95 e 100%), onde permaneceram por 20 minutos em cada uma. A solução de concentração 100% foi repetida por três vezes, com imersão por 10 minutos a cada troca de solução (PEREIRA *et al.*, 2014).

Posteriormente, os espécimes foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos e, então, acondicionados em recipientes hermeticamente fechados, contendo sílica gel, por pelo menos 24 horas antes da metalização. Os espécimes

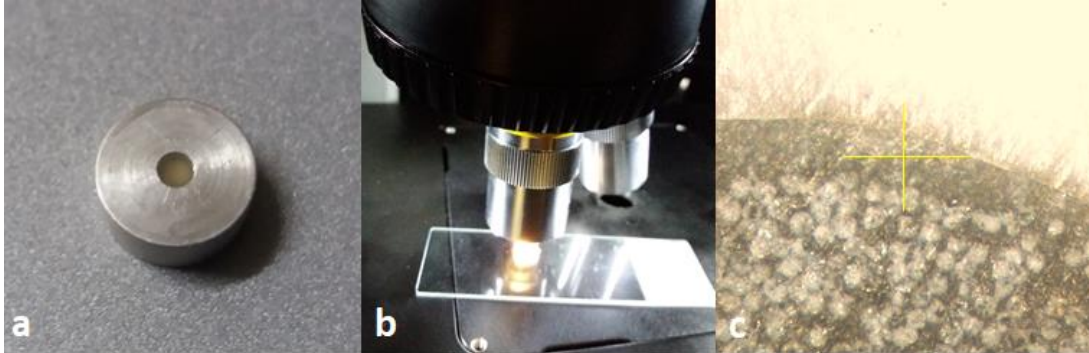
foram revestidos por carbono (Sputtering, modelo Balzers SCD 050) e observados em MEV (FEG – FEI, FEG Quanta 200F, Hillsboro, OR, EUA), sob aceleração de voltagem variável de 15 kV. As imagens foram obtidas com magnificações progressivas (50, 500 e 1.000X), tendo como objetivo a descrição de características morfológicas da linha de cimentação para cada grupo experimental em todos os terços radiculares.

3.6.5 Análise do Grau de Conversão dos Cimentos Resinosos

Foi utilizado equipamento para medidas Raman (HYPERION IR microscope, Vertex 70, Bruker, Ettlingen, Alemanha), no Laboratório de Espectroscopia Raman, do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. Este equipamento possui detector (CCD) de germânio resfriado por nitrogênio líquido. Foi utilizado o laser Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) a 1064 nm. Inicialmente, foram realizados testes para a definição da potência de trabalho, quantidade de varreduras e acumulações de espectros necessários para otimizar a relação sinal/ruído.

As pastas base e catalisadora dos cimentos *RelyX Ultimate* e *RelyX U200* foram dispensadas em bloco de papel (5,0 mm de comprimento), manipuladas com espátula metálica por 10 segundos, depositadas em um dispositivo metálico com orifício e obtido um espectro, com 1000 mW de potência do laser, resolução de 4 cm^{-1} para 700 acumulações em número de onda de 100 a 3.500 cm^{-1} . Este procedimento foi repetido por três vezes com diferentes porções dos cimentos e assim definiram-se os espectros dos cimentos não polimerizados. Para a análise do grau de conversão dos cimentos nos espécimes em cada condição experimental estudada, após 24 horas de cimentação dos pinos de fibra de vidro, foram obtidos três espectros em diferentes regiões da linha de cimentação (aumento de 10X) com as mesmas condições descritas acima, obtendo-se os espectros dos cimentos polimerizados (FIGURA 24).

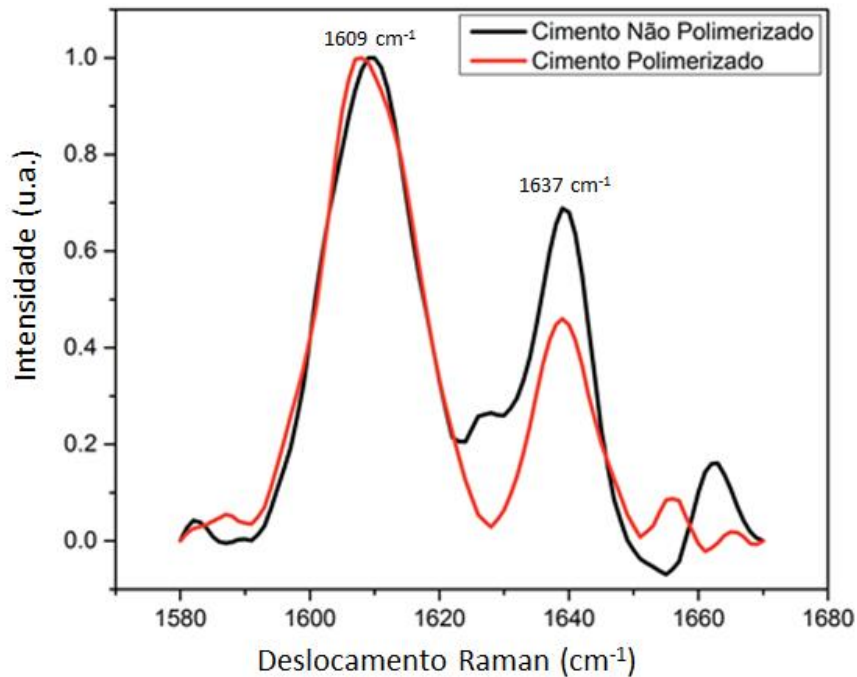
Figura 24 - **a.** Cimento resinoso inserido no dispositivo metálico para obtenção dos espectros do cimento não polimerizado, **b.** Espécime do grupo experimental sendo analisado, **c.** Imagem da linha de cimentação obtida com o aumento de 10X identificando a área de análise.



Fonte: Do autor, 2019.

A espectroscopia Raman avalia o grau de conversão do cimento resinoso com base na variação da intensidade a 1637 cm^{-1} , relativa ao pico da dupla ligação entre carbonos no metacrilato, e a 1609 cm^{-1} , pico correspondente à ligação dupla entre carbonos do anel aromático que permanece estável durante a conversão do monômero em polímero (FIGURA 25).

Figura 25 - Espectros obtidos com os cimentos não polimerizado e polimerizado, em destaques os picos 1609 cm^{-1} e 1637 cm^{-1} .



Fonte: Do autor, 2019.

Para calcular o grau de conversão, a razão da intensidade dos picos entre 1605 a 1610 cm^{-1} e entre 1635 a 1640 cm^{-1} foram utilizadas na seguinte equação: $\text{GC (\%)} = 100 \times [1 - (R_{\text{Polimerizado}}/R_{\text{Não polimerizado}})]$ Onde, R = intensidade da banda a 1637 cm^{-1} / intensidade da banda a $\approx 1609\text{cm}^{-1}$ (PIANELLI *et al.*, 1999). O ajuste analítico das curvas foi feito na região entre 1571 e 1655 cm^{-1} , considerando-se os picos com amplitude Voigt G/L para o ajuste em largura e altura (OriginLab Corporation, Northampton, MA, Estados Unidos), que considera as curvas Lorentzianas. Os valores máximos identificados na ordenada “Y” (intensidade) para os picos de interesse foram extraídos para o cálculo do grau de conversão.

3.7 Análise dos Dados

Inicialmente, foram analisadas a normalidade (*Shapiro-Wilk*, $p > 0,05$) e homocedasticidade (*Levene*, $p > 0,05$) dos dados, para que assim fossem definidos os testes estatísticos a serem utilizados.

Os efeitos da idade, origem, terço radicular e suas interações nos aspectos morfológicos, químicos e mecânicos foram analisados pelo ANOVA *Three-way*, seguido de comparações múltiplas pelo pós-teste de *Tukey*. Com exceção dos dados do teste de resistência à flexão em três pontos que foram analisados pelo teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Tukey*.

Correlações entre os aspectos químicos e mecânicos foram verificadas pelo Coeficiente de Correlação de *Pearson*.

Os efeitos da idade, origem, terço radicular e suas interações nos valores de resistência de união foram analisados pelo ANOVA *Three-way*, seguido de comparações múltiplas pelo pós-teste de *Tukey*.

Os efeitos da idade, origem, terço radicular e suas interações nos valores de grau de conversão dos cimentos resinosos foram analisados pelo ANOVA *Three-way*. Diante da ausência de efeitos significativos para os fatores idade e origem, comparações dos valores de grau de conversão entre os cimentos resinosos em cada terço radicular foram realizadas pelo teste t de *Student*.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* estatístico *SPSS 20* (*Statistical Product and Service Solutions*, SPSS, Chicago, Estados Unidos), adotando um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo serão reportados em dois artigos que estão apresentados a seguir. O Artigo 1 contempla os dados das análises do efeito da idade nos aspectos morfológicos, químicos e mecânicos das dentinas radiculares humana e bovina. O Artigo 2 aborda os resultados encontrados nas análises do efeito da idade na resistência de união ao cisalhamento por extrusão (*push-out*) de pinos de fibra de vidro fixados nas dentinas radiculares e os dados do grau de conversão dos cimentos resinosos utilizados.

4.1 Artigo 1

Periódico pretendido para publicação: *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, ISSN: 1751-6161.

The Effects of Aging on the Morphological, Chemical and Mechanical Aspects of Human and Bovine Root Dentin

Francisco Ivison Rodrigues Limeira¹, Monica Yamauti², Viviane Valquíria do Nascimento³, Cristiano Fantini⁴, Allyson Nogueira Moreira² and Cláudia Silami de Magalhães²

¹Post-Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

²Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Post-Graduate Program in Physics, Faculty of Physics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴Department of Physics, Faculty of Physics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Corresponding author:

Cláudia Silami de Magalhães, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Telephone and fax number: +55 31 3409-2440

E-mail: silamics@yahoo.com

ABSTRACT

This study compared and analysed the effect of age on the morphological, chemical and mechanical aspects of human and bovine root dentin in each root third. Single-rooted human teeth were divided into young (20 to 30 years) and old (over 60 years) groups (n=6). Bovine mandibular incisors were divided into young (24 to 36 months) and adult (over 48 months) groups (n=6). The analyses were performed by scanning electron microscopy, energy dispersive spectroscopy, wavelength dispersive spectroscopy, Fourier-transformed raman spectroscopy, nano-indentation, uniaxial compression and three-point flexural tests. The first incisor of young bovine presented the largest numbers of dentinal tubules and the old human single-rooted group presented the lowest values for number, diameter and area of dentinal tubules ($p < 0.05$). Old human root dentin presented a highest amount of calcium, Ca/P ratio and relative mineral concentration ($p < 0.05$). Human root dentin presented a reduction in the values of the amide I/amide III ratio and amide I/CH₂ ratio with aging ($p < 0.05$). The old human root dentin presented the highest values of nano-hardness, elastic modulus, compression strength, but the lowest flexural strength and flexural modulus ($p < 0.05$). Aging affected the number, diameter and area of dentinal tubules, the degree of mineralisation and the organization and quality of collagen, with increased values of certain mechanical properties of human root dentin. Bovine root dentin was not affected by aging.

Keywords: root dentin; aging; scanning electron microscopy; energy dispersive spectroscopy; wavelength dispersive spectroscopy; Fourier-transformed raman spectroscopy; nano-indentation; uniaxial compression test; three-point flexural test.

1. Introduction

The use of human teeth in dental research presents limitations such as difficulty obtaining a sufficient sample with adequate quality, standardisation concerning the source and age, and ethical issues (Camargo et al., 2007; Yassen et al., 2011; Costa et al., 2015; Soares et al., 2016). Thus, bovine teeth have been used as a substitute for human teeth in dental research because they have similar morphological and physicochemical properties (Yassen et al., 2011).

Although there are some data substantiating the use of bovine teeth replacing human ones when coronary substrates are used, there is still no conclusive data in the literature regarding the characterisation of bovine root dentin and its viability for replacing human root dentin (Schilke et al., 2000; Camargo et al., 2007; Yassen et al., 2011; Costa et al., 2015). Despite this, bovine root canals have been used to analyse the penetration and effects of endodontic intracanal medication, sealers or filling materials, auxiliary chemical substances, dentinal tubule contamination and the bond strength of luted fiber posts (Gomes et al., 2003; Moreira et al., 2009; Guerreiro-Tanomaru et al., 2012; Palo et al., 2012; Arias et al., 2016; Bohrer et al., 2018).

The hard tissue that occupies the majority of the human tooth is dentin that is composed of approximately 45% mineral material, 33% organic material (collagen type I) and 22% water (Tjäderhane et al., 2012). Dentine has a hierarchical structure, in which collagen and apatite molecules cross each other on a nano-scale. Subsequently, these composites organize into a microscopic morphology, forming tubules with different sizes and densities (Katz et al., 2007). The dentinal tubules host the odontoblastic processes and fill in the complete extent from the pulp to the dentin enamel junction (Kinney et al., 2005). Peritubular dentin is highly mineralized and encloses the lumen of the tubules containing apatite crystals

and organic proteins. A matrix of collagen fibers reinforced by apatite constitutes the intertubular dentin situated among the tubules (Marshall et al., 1997). The specific arrangement and order of the nano- and micro-structures produce a macroscopic anisotropy with certain functional behaviours (Katz et al., 2007).

Studies comparing human and bovine root dentin substrates in different fields of dental research are common (Hara et al., 2003; Camargo et al., 2006; Camargo et al., 2007; Galhano et al., 2009; Wegehaupt et al., 2010; Kato et al., 2011; Costa et al., 2015; Lippert et al., 2015; Soares et al., 2016) but few have analysed the effects of substrate age on the aspects analysed (Camargo et al., 2007). Dentin is found to be highly affected by the effect of age on its properties due to its dynamic characteristics (Arola and Reprogel, 2005; Bajaj et al., 2006; Senawongse et al., 2006). With aging the human dentin thickness increases and the morphology changes as the tubules become gradually obliterated with inorganic material. With time, the higher mineral content makes tissue transparent and generally is called sclerotic dentin (Kinney et al., 2005). As the microstructure of dentin modifies with age, corresponding changes are expected in its mechanical behaviour (Ryou et al., 2015). There is a reduction in the fatigue strength (Kinney et al., 2005; Ivancik et al., 2011), fatigue crack growth resistance (Ivancik et al., 2012) and fracture toughness (Nazari et al., 2009) with age.

Thus, the objective of this study was to compare and analyse the effect of age on the morphological, chemical and mechanical aspects of human and bovine root dentin. The null hypotheses tested were: 1) there is no effect of age on the morphological aspects of human and bovine root dentin in each root thirds; 2) there is no effect of age on the chemical aspects of human and bovine root dentin; and 3) there is no effect of age on the mechanical aspects of human and bovine root dentin.

2. Materials and Methods

This study was approved by the Ethics Committee in Research (protocol 1.803.933) and Ethics Committee on the Use of Animals (protocol 372/2016) of the Federal University of Minas Gerais.

Permanent human and bovine teeth, healthy and single-rooted were selected. The teeth were divided into four groups in accordance with age range: young human (20 to 30 years), old human (over 60 years), young bovine (24 to 36 months) and adult bovine (over 48 months). Animals with up to four permanent incisor teeth are considered young (24 to 36 months) and with eight teeth are considered adults (over 48 months). After extraction, teeth were cleaned, immersed in 0.1% thymol solution for 24 hours and frozen at -4 °C until the preparation. The teeth were not stored for more than three months after extraction. The crowns were sectioned 1 mm below the cement-enamel junction using a precision saw (IsoMet 1000, Buehler, Illinois, United States) at constant water cooling.

2.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Twelve human teeth were divided into two groups according to age group (young and old, n = 6) and thirty-six bovine teeth were divided into six groups (n = 6) according to age (young and adult) and tooth type (first incisor young, second incisor young, first incisor adult, second incisor adult, third incisor adult and canine adult).

The roots were longitudinally sectioned in the vestibular-lingual direction using a precision saw under constant water cooling to produce two hemi-sections. One hemi-section of each teeth, randomly, was included in orthophthalic resin (Cristal 5061, Minas Gerais, Brazil) and the surfaces were polished by hand with increasing 400, 600, 800, 1200, 1500, 2000 and 2500 grit silicon carbide abrasive papers under constant irrigation with water (APL-4, Arotec, São Paulo, Brazil) and 1.0, 0.5 and 0.25 μm diamond paste (Erios, São Paulo, Brazil) on felt discs. The specimens were dipped in ultrasonic cleaning bath with distilled

water for 15 min between each exchange of abrasive papers and diamond pastes to remove residues and the smear layer. The total root length was measured with a digital calliper (Mitutoyo, São Paulo, Brazil), and the coronal, middle, and apical thirds were delimited.

The specimens were dried for 24 h at 37 °C with silica gel, mounted on aluminium stubs and coated with a carbon layer (15 nm thick) under medium vacuum for SEM examination (FEG Quanta 200F, Hillsboro, Oregon, United States). For each root third, three images were obtained, resulting in 864 photomicrographs.

The images were analysed using ImageJ 1.46 software (NIH, Maryland, United States), by a single calibrated evaluator (intra-examiner Cohen's Kappa ≥ 0.75). The number of dentinal tubules was determined from a standardised total area of 10,000 μm^2 (1,000X magnification), counting all unobstructed tubules in each root third (number of tubules per mm^2). Tubule diameters and areas of dentinal tubules were determined in a total area of 2,500 μm^2 (5,000X magnification), counting all dentinal tubules in each photomicrograph obtained (Camargo et al., 2007).

2.2. Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) and Wavelength Dispersive Spectroscopy (WDS)

For elemental composition analysis, twenty four human and bovine teeth were divided into four groups according to origin and age group ($n = 6$). The samples analysed were prepared similarly to the specimens for analysis by SEM.

The specimens were analysed by electron microprobe (Jeol JXA 8900 RL WD/ED Combined Microanalyzer, JEOL USA, Massachusetts, United States), equipped with WDS and EDS. Using the EDS, an elementary mapping of the sample was carried out at five different points per root third. The sample was irradiated by focused electron beam (15 kV, 100 sec) and identified the presence of calcium (Ca), phosphorus (P), sodium (Na) and magnesium (Mg). Then, WDS analysis was performed on backscattered electron images

(30,000X) to quantify (%) the elemental composition of the sample in five different areas in each irradiated root third (15 kV, 20 nA, 10 sec). For the quantification of elements, the following were used as standards: calcium pyrophosphate ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) for Ca and P, Jadeite for Na and magnesium oxide (MgO) for Mg.

2.3. *Fourier Transformed Raman Spectroscopy (FT-Raman)*

Twenty four human and bovine teeth were divided into four groups according to origin and age group ($n = 6$). The root hemi-section was measured with a digital calliper (Mitutoyo, São Paulo, Brazil) and sectioned transversely with a precision saw (IsoMet 1000, Buehler, Illinois, United States) through the root thirds. The specimens' surfaces were polished by hand with silicon carbide abrasive papers 600 and 800 grit (APL-4, Arotec, São Paulo, Brazil) under irrigation with distilled water and dipped in an ultra-sonic bath with deionised water for 15 min between each exchange of abrasive papers to remove residues and the smear layer.

Three spectra of each surface were obtained by FT-Raman spectroscopy (module RAM II FT-Raman, Vertex 70, Bruker, Baden-Württemberg, Germany) with a germanium diode detector cooled by liquid Nitrogen. The samples were excited by an air-cooled Nd:YAG laser ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) with a power of 150 mW. The spectral resolution was set to 4 cm^{-1} and one spectrum was accumulated for each measurement with 250 scans in wavenumbers from 35 to 3596 cm^{-1} .

The spectra obtained were analysed by the OriginPro 7.5 software (OriginLab Corporation, Massachusetts, United States). The baseline spectra were corrected and then normalised to the 960 cm^{-1} peak. The peaks at 960 cm^{-1} and 1070 cm^{-1} are attributed to the hydroxyapatite phosphate group ($\text{PO}_4^{3-} \nu_1$) and carbonate group ($\text{CO}_3^{2-} \nu_1$) vibrations, respectively. Vibration peaks at 1246/1270, 1450 and $1655/1667 \text{ cm}^{-1}$ were assigned to amide III, CH_2 and amide I, respectively (Xu and Wang, 2011).

Based on the Raman spectra, the following data were analysed:

- Relative mineral concentration: ratio of 960 cm^{-1} phosphate (PO_4^{3-} ν_1) to amide I, to analyse the differences in the mineral/matrix ratio (M:M), refers to the relative maximum degree of mineralisation (Toledano et al., 2015).
- Gradient in mineral content (GMC): this was assessed as the relationship between the ratio of heights from 1070 cm^{-1} (carbonate) (CO_3^{2-}) to 960 cm^{-1} (phosphate) (PO_4^{3-}), indicating carbonate substitution for phosphate (Schwartz et al., 2012).
- Crystallinity: it was measured as the full width at half maximum (FWHM) of the phosphate band (960 cm^{-1}) and carbonate band (1070 cm^{-1}) (Toledano et al., 2015). Narrower spectral peak widths are associated with higher degrees of mineral crystallinity (Karan et al., 2009).
- Ratio amide I/amide III: concerned the organisation of collagen (Toledano et al., 2015).
- Ratio amide I/ CH_2 : refers to changes in the quality of collagen (Toledano et al., 2015).

2.4. Atomic Force Microscopy (AFM)-based nano-indentation

Twenty four human and bovine teeth were divided into four groups according to origin and age group ($n = 6$). The root hemi-section was measured with a digital calliper (Mitutoyo, São Paulo, Brazil) and sectioned transversely with a precision saw (IsoMet 1000, Buehler, Illinois, United States) through the root thirds. The specimens were included in orthophthalic resin (Cristal 5061, Minas Gerais, Brazil) and the surfaces were polished by hand with increasing 400, 600, 800, 1200, 1500, 2000 and 2500 grit silicon carbide abrasive papers under constant irrigation with water (APL-4; Arotec, São Paulo, Brazil) and 1.0, 0.5 and 0.25 μm diamond paste (Erios, São Paulo, Brazil) on felt discs. Between each exchange of abrasive

papers and diamond paste, the specimens were dipped in an ultra-sonic bath (Model Cd4820I, Kondentech, São Paulo, Brazil) with distilled water for 15 min to remove residues.

Nano-indentation was performed using a AFM (MFP-3D-AS, Asylum Research, Santa Barbara, CA, EUA), modified with a Berkovich diamond indenter (Hysitron Inc., Minneapolis, MN, USA) under wet conditions. Each specimen was tested at three areas. For each area ($50 \times 50 \mu\text{m}^2$), sixteen indentations, approximately $10 \mu\text{m}$ apart, were performed. The load was $2.000 \mu\text{N}$ and was held for 5 s, with loading/unloading for 10 s each. The nano-hardness and elastic modulus values were quantified from the load-displacement curve, using the model of Oliver and Pharr (1992), both in Gigapascal (GPa).

2.5. Uniaxial compression test

Twenty four human and bovine teeth were divided into four groups according to origin and age group ($n = 6$). Each root was longitudinally sectioned with a precision saw (IsoMet 1000, Buehler, Illinois, United States) and a second section, parallel to the first (distance of 2.5 mm), was made to obtain a specimen of dentin discarding the convex part of the root. Other sections were made on the dentin specimen to obtain two specimens in each root third with a cuboid shape (0.7 mm of thickness x 2 mm of width x 2 mm of length) (Zaytsev, 2015). The specimens were polished, when necessary, to reach the standardised dimensions, with silicon carbide abrasive papers 600, 1000 and 1200 grit (APL-4, Arotec, São Paulo, Brazil) under irrigation with distilled water. The specimens were dipped in an ultra-sonic bath (Model Cd4820I, Kondentech, São Paulo, Brazil) with distilled water for 5 min to remove residues.

The uniaxial compression test was performed in universal testing machine (EZ-LX Long-Stroke Model, Shimadzu, Kyoto, JPN) with a 5 N load cell at a speed of 0.1 mm/min. The compression strength (Mpa) was taken as maximal stress on the deformation curve. The

elastic modulus (GPa) was calculated from the stress-strain diagram, by the following formula: $E = \sigma/\varepsilon$. Where, $\sigma = F/A$ [σ = stress; F = maximum applied force (N); A = cross-sectional area of specimen (mm^2)] and $\varepsilon = \Delta l/l_0$ [ε = elastic uniaxial deformation; Δl = displacement in the region of elastic deformation (mm); l_0 = initial length of specimen (mm)].

2.6. Three-point flexural test

Twenty four human and bovine teeth were divided into four groups according to origin and age group ($n = 6$). Each half of the root was longitudinally sectioned with a precision saw (IsoMet 1000, Buehler, Illinois, United States) in a dentin bar (10 mm long x 1 mm wide x 1 mm thick) from the coronal-middle area (Cullen et al., 2015). No enamel or cementum was included in the dentin bars. The bars were polished, when necessary, to reach the standardised dimensions, with silicon carbide abrasive papers 600, 1000 and 1200 grit (APL-4, Arotec, São Paulo, Brazil) under irrigation with distilled water. These samples were stored in physiologic saline for one week until the test.

The three-point flexural test was performed using universal testing machine (EZ-LX Long-Stroke Model, Shimadzu, Kyoto, JPN), 5 N load cell, with the distance between the center support points fixed at 8 mm. The load cell was applied perpendicular to the long axis of the specimen with a 0.25 mm/min crosshead speed until fracture. The flexural strength and flexural modulus were calculated using the following equations: $\sigma_f = 3Fl/2bh^2$ and $E_f = Fl^2/4bh^3d \times 10^{-3}$, where F is the load (N) at the highest point of load-deflection curve, l is the distance between the center supports, b is the width, h is the thickness of the specimen and d is deflection. The values b and h were measured with a digital caliper (Mitutoyo, São Paulo, Brazil).

2.7. Statistical analysis

The data obtained in the morphological, chemical and mechanical analyses showed normal distribution (Shapiro-Wilk test, $p > 0.05$) and homogeneity of variance (Levene test, $p > 0.05$).

The effects of age, origin, root third and their interactions on morphological, chemical and mechanical aspects were analysed by three-way ANOVA, followed by Tukey's test multiple comparisons. Data from the three-point flexural test were analysed by the two-way ANOVA and Tukey honest significant differences post hoc test.

Correlations between the chemical and mechanical aspects were verified by the Pearson Correlation Coefficient.

All statistical analyses were performed using the statistical software SPSS 20 (Statistical Product and Service Solutions, SPSS, Chicago, USA), at a 5% level of significance.

3. Results

3.1. Scanning Electron Microscopy

For number, diameter and area of the dentinal tubules, three-way ANOVA showed significant effects for the analysed factors (age, origin and third root) ($p < 0.05$), without significant interactions ($p > 0.05$).

The old human single-rooted group presented the lowest numbers of dentinal tubules, differing from the single-rooted young human group and groups of bovine teeth of both ages, in all root thirds ($p < 0.05$). The young bovine first incisor group presented the largest numbers of dentinal tubules, differing from the groups of human teeth of both ages, in all root thirds ($p < 0.05$) (Figure 1). The old human single-rooted group presented the smallest diameters and areas of dentinal tubules, differing from the young human single-rooted group

and groups of bovine teeth of both ages in all root thirds ($p < 0.05$) (Figures 2 and 3). Regarding the morphological aspects analysed, the adult canine bovines formed the group that was most similar to the young human single-rooted group. SEM representative images of the young human single-rooted, old human single-rooted, young bovine first incisor and adult canine bovine in the different root thirds are shown in Figure 4.

3.2. *Energy Dispersive Spectroscopy and Wavelength Dispersive Spectroscopy*

For Ca and Ca/P, three-way ANOVA showed significant effects of tooth age and origin ($p < 0.05$), without any significant interaction ($p > 0.05$). Three-way ANOVA showed no significant effects and interactions of the analysed factors (age, origin and third root) for the P, Na, Mg.

The results of the analysis of the elemental composition showed that old human root dentin presents a higher amount of Ca in all the root thirds, differing from all groups ($p < 0.05$). The concentration of Na in adult bovine root dentin was the highest, differing from young bovine root dentin, in all the root thirds, and from human root of both ages in coronal and apical thirds ($p < 0.05$). The Ca/P ratio in adult human root dentin was the highest, differing from bovine root dentin of both ages, in coronal and apical thirds ($p < 0.05$) (Table 1).

3.3. *Fourier Transform Raman Spectroscopy*

Significant effects and interactions (origin, age and root third) were observed for crystallinity band at 960 cm^{-1} , amide I/amide III ratio and amide I/CH₂ ratio ($p < 0.05$). For the relative mineral concentration, origin and age showed a significant effect ($p < 0.05$) and for gradient in mineral content, age and root third also showed a significant effect ($p < 0.05$).

The results of the Tukey test showed that the old human dentin presented the highest value of relative mineral concentration ($p < 0.05$). Old human dentin presented the highest gradient for mineral content, differing from young human dentin in middle and apical thirds ($p < 0.05$) and bovine dentin of both ages in all the root thirds ($p < 0.05$). Old human dentin presented the highest values of crystallinity band at 960 cm^{-1} and differed from all groups ($p < 0.05$). For the amide I/amide III ratio and amide I/CH₂ ratio, the old human dentin presented the lowest values differing statistically from the other groups ($p < 0.05$) (Table 2).

3.4. Nano-indentation

For nano-hardness and elastic modulus, all factors analysed had significant effects ($p < 0.05$), without any significant interaction ($p > 0.05$).

Old human root dentin presented the highest values of nano-hardness, differed from all groups and decreased from the coronal third to the apical ($p < 0.05$). Values of elastic modulus were higher in old human root dentin, with statistical differences of the other groups in the middle and apical thirds ($p < 0.05$) (Table 3).

3.5. Uniaxial compression test

For compression strength, all factors analysed showed significant effects ($p < 0.05$), and for elastic modulus, origin and age showed significant effects ($p < 0.05$).

Old human root dentin showed the highest values of compression strength and differed from all groups ($p < 0.05$). Old human root dentin showed the highest values of elastic modulus, with statistical differences from the other groups in all root thirds, except on young human root dentin, in coronal third ($p < 0.05$) (Table 3).

3.6. Three-point flexural test

For flexural strength, two-way ANOVA showed significant effects and interactions for the age and origin ($p < 0.05$). For flexural modulus, significant effects were observed for the age and origin ($p < 0.05$), without significant interaction ($p > 0.05$).

Old human root dentin showed the lowest values of flexural strength and flexural modulus and differed from all groups ($p < 0.05$) (Table 4).

3.7. Pearson correlation coefficient

In the correlation analysis between the chemical (EDS and WDS) and mechanics aspects for each experimental group, significant correlations were observed. Old human root dentin: nano-hardness and phosphorus ($r = 0.60$, $p = 0.00$); elastic modulus of nano-indentation and Ca/P ratio ($r = -0.56$, $p = 0.01$); compression strength and calcium ($r = -0.53$, $p = 0.02$). Adult bovine root dentin: compression strength and calcium ($r = 0.48$, $p = 0.04$).

Significant correlations between the chemical (FT-Raman) and mechanics aspects for each experimental group were also observed. Young human root dentin: compression strength and crystallinity band at 960 cm^{-1} ($r = -0.60$, $p = 0.00$). Old human root dentin: nano-hardness and relative mineral concentration ($r = 0.77$, $p = 0.00$); nano-hardness and amide I/amide III ratio ($r = 0.66$, $p = 0.00$); nano-hardness and amide I/CH₂ ratio ($r = 0.55$, $p = 0.01$); elastic modulus of nano-indentation and amide I/CH₂ ratio ($r = 0.53$, $p = 0.02$); compression strength and crystallinity band at 960 cm^{-1} ($r = 0.60$, $p = 0.00$); compression strength and Amide I/Amide III ratio ($r = -0.67$, $p = 0.00$); compression strength and amide I/CH₂ ratio ($r = -0.57$, $p = 0.01$); flexural modulus and amide I/Amide III ratio ($r = -0.85$, $p = 0.03$). Adult bovine root dentin: compression strength and crystallinity band at 960 cm^{-1} ($r = -0.49$, $p = 0.03$).

4. Discussion

Decrease in number, diameter and area of the dentinal tubules of human root dentin were observed with aging. However, morphological aspects of bovine root dentin were not affected by aging. Thus, the first tested hypothesis was partially rejected.

Tubularity is a central characteristic of dentin, affecting, for example, its mechanical properties, its ability to withstand occlusal forces, and its behaviour in dentin bonding (Tjäderhane et al., 2012). Gradual obliteration of the dentinal tubules occurs with aging resulting in a reduction in the lumen diameters due to the dissolution and re-precipitation of minerals from the inter-tubular dentin (Nalla et al., 2005; Porter et al., 2005). The number of dentinal tubules decreases with increasing age, with a lower number in the apical third, and a decrease in the diameter and area of the dentinal tubules (Vasiliadis et al., 1983; Nalla et al., 2005; Porter et al., 2005). In contrast, Xu et al., (2014), comparing young and old human root dentin, observed that the tubular area of old dentine was smaller than that of young dentine at the coronal regions and no age-related difference was found for tubular density. This inconsistency with our results can be explained due to methodological differences. In the present study all the unobstructed dentin tubules present in the analysis area and were counted and measured while in the other study obstructed tubules were also considered.

Camargo et al. (2007) compared the number and diameter of the dentinal tubules of the human root dentin with different age groups and the bovine root of different types of teeth, observing a statistically significant difference only in the number of the dentinal tubules relative to origin of the substrate. The number of tubules of the bovine dentin was higher than human specimens and the diameter of dentin tubules did not differ. Also, Costa et al. (2015) evaluated the morphological characteristics between human and bovine primary root canals. The authors observed that the radicular dentin structure of human and bovine primary teeth differs in terms of the tubule density, as the primary bovine teeth showed a higher number,

and are similar in terms of the diameter. Thus, our results are in agreement with these findings considering that the first incisor bovine young group presented the largest numbers of dentinal tubules and the single-rooted human young group presented dentinal tubules diameters similar to those of bovine root dentin.

Considering that the aging may influence the mineral concentrations in human and bovine root dentin, the elemental composition between the young and adult/old age groups was compared. The old human root dentin presented a higher concentration of Ca and Ca/P ratio and adult bovine root dentin presented a higher concentration of Na in coronal and apical thirds. The higher degree of mineralisation of human root dentin compared to bovine and the effect of age on the increase of the degree of mineralisation was noticeable. Thus, the second hypothesis tested was rejected.

Dentine is predominately composed of hydroxyapatite crystals with the dimensions of 60–70 nm length, 20–30 nm width, and 3–4 nm thickness. Teeth content of Ca and P range from 34–39% and 16–18% by weight, respectively. Cations (Na^+ , K^+ and Mg_2^+) can substitute the calcium position of the hydroxyapatite matrix while anions (F^- , Cl^- and CO_3^{2-}) are incorporated into the hydroxyl and phosphate positions. Close to 40 trace elements (≥ 1000 and ≤ 100 ppm) may be present proceeding from dental pulp capillaries and saliva (Reitznerová et al., 2000). Trace elements incorporated into the crystalline structure alter the physicochemical and mechanical properties of hydroxyapatite (Teruel Jde et al., 2015).

Our results agree with Teruel Jde et al. (2015), who showed that Ca, P, Na and Mg constitute the most abundant and basic metal ions that form the structure of mineralised tooth tissues. The Ca/P ratio in old human root dentin was more similar to pure hydroxyapatite (1.67) (Taube et al., 2010). Disagreeing with our results, Xu et al. (2014) found an increase in Ca and Ca/P ratio content only in the coronal third of the old human root dentin, with no age-induced differences in P content. This could be explained by the fact that the concentrations

of trace elements may vary with gender, type of tooth, nutrition and environmental pollution (Fischer et al., 2009). Furthermore, the mineral composition gradient decreases from the pulp to the enamel and from the peritubular to the intertubular region (Kinney et al., 1996; Tjäderhane et al., 2012).

In the analysis of the molecular chemical structure of human and bovine root dentin by FT-Raman, the effect of age on the chemical composition of human root dentin was identified. The mineral phase in dentine mainly consists of carbonate-substituted hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-y}(\text{CO}_3)_{x+y}$, where $0 \leq x \leq 6$, $0 \leq y \leq 2$) in the form of small plates (Tjäderhane et al., 2012). These changes may alter crystallinity, crystal size, stability and solubility of the hydroxyapatite structure. The results shown by the FT-Raman analysis were in agreement with those observed by WDS. The relative mineral concentration showed that old human root dentin presents as the most mineralised group, with reduced space occupied by the organic matrix due to the effect of age (Toledano et al., 2015). The increase in gradient in the mineral content in old human root dentin is related to the presence of a prominent carbonate band at around 1070 cm^{-1} in the Raman spectrum, demonstrating the degree of carbonate substitution in the lattice structure of the apatite (Salehi et al., 2013). The crystallinity of these bands represents the percentage of crystalline material, which correlates to the organization inside crystals (Reyes-Gasga, 2013). The narrower the width of the peak is the higher the degree of mineral crystallinity (Karan et al., 2009). Thus, age had a decrease in the degree of crystallinity band at 960^{-1} of human root dentin.

Changes were detected in the molecular conformation of the contents of the dentin organic matrix. The dentin organic phase contains about 90% fibrous proteins (mainly type I collagen) besides lipids and non-collagenous matrix proteins (Tjäderhane et al., 2012). The amide I/amide III ratio were higher in young human root dentin, indicating a higher degree of organisation, while these peak ratios in the old human dentin were the smallest, evidencing a

disorganisation of collagen with aging. Amide I is the most intense vibrational band in proteins and is governed primarily by the stretching vibrations of the C=O (70-85%) and C-N (10-20%) groups and is directly related to the backbone conformation and the hydrogen bonding pattern (Xu and Wang, 2012). Amide III is a very unstable and complex band that depends on the details of the force field, the nature of the side chains and the hydrogen bond (Xu and Wang, 2012). For the amide I/CH₂ ratio, it was demonstrated that old human root dentin had a lower ratio indicating altered collagen quality (Salehi et al., 2013; Toledano et al., 2015). CH₂ represents the intensity of vibrations of collagen molecule side chains and it was used because of its low sensibility to molecular orientation compared to the amide I band (Salehi et al., 2013). The collagen proteolysis has a significant impact on the structural integrity of dentin. Dentin collagen features a great number of intermolecular covalent cross-links between the chains providing the stability and tensile strength required by the structure (Yamauchi and Sricholpech, 2012).

The mechanical aspects of human root dentin were affected by aging. The values of properties analysed by nano-indentation and uniaxial compression were higher in old human root dentin, and by three-point flexural were lower in old human root dentin. However, mechanical aspects of bovine root dentin were not affected by aging. Thus, the third tested hypothesis was partially rejected.

Nano-indentation test showed that the old human root dentin have significantly higher nano-hardness and elastic modulus than the young human root dentin. These findings are similar to those reported by Xu et al. (2014), which evaluated the effect of age on the mechanical properties of root intertubular dentine and observed higher nano-hardness and elastic modulus only in the coronal third of the old dentin. However, in the present study it was not possible to evaluate the intertubular and peritubular dentin independently, although it

is known that there are structural and mechanical differences between them (Kinney et al., 1996; Ziskind et al., 2011; Ryou et al., 2015).

The old human root dentin showed values of compressive strength and modulus of elasticity superior to young human root dentin, in agreement with the findings of Panfilov et al. (2012). The human dentin is a biomineral, with elastic and plastic properties, while its strength is close to synthesized calcium hydroxyapatite (Zaytsev et al., 2014; Zaytsev, 2015). Part of organic compounds in dentin may be the cause of such unusual deformation behavior. The elastic-plastic collagen fibers partially provide elasticity and plasticity of dentin, while the particles of calcium hydroxyapatite inside organic matrix serve as filler and keep the strength to dentin (Buehler, 2006; Svensson et al., 2010). Thus, structural changes due to aging may influence the mechanical behavior of dentin under compression.

Old human root dentin showed the lowest values of flexural strength and flexural modulus, differing from all groups. Shinno et al. (2016) showed also that the flexural strength and toughness of human root dentin decreases with aging. These results can be justified by the morphological and chemical aspects presented by aged dentin, such as increased mineralisation, decreased dentin tubules and embrittlement of collagen due to accumulation of advanced glycation end-products, decreasing the resistance against crack propagation (Kinney et al., 2005; Nalla et al., 2005; Porter et al., 2005; Shinno et al., 2016).

From the analysis of the correlation coefficients between the chemical and mechanical aspects analyzed, it is possible to elucidate some of the results found. In general, it was observed that age has an effect on the morphological, chemical and mechanical aspects of human root dentin. However, based on the correlation coefficients, there was significant effect of the chemical composition of the human root dentin on its mechanical behavior, especially, the influence of organic components on strength of dentin.

The morphological, chemical and mechanical aspects of bovine root dentin were not affected by aging. This finding may be justified by the short time difference between the young and adult age groups. The life expectancy of bovine in nature is 15 to 20 years, however in the meat and milk industry the life expectancy of these animals is only 18 months and 48 months, respectively. Thus, due to the difficulty of obtaining a sample of old bovine teeth, we opted for the analysis of young and adult bovine teeth.

5. Conclusions

According to the results obtained, the following conclusions were drawn:

- Age affected the morphological aspects of human root dentin, with a decrease in the number, diameter and area of the dentinal tubules.
- Aging increased mineralisation in and had a negative effect on the organisation and quality of collagen in human root dentin.
- Aging increased the values of nano-hardness, elastic modulus, compression strength, and reduced flexural strength and flexural modulus in human root dentin.
- Morphological, chemical and mechanical aspects of bovine root dentin were not affected by aging.

Thus, studies that use bovine root dentin in substitution in humans should consider the effect of origin and age on the morphological, chemical and mechanical aspects of these dental substrates.

Acknowledgements

This study was financed by the *Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais* (PPM IX- 0050715 and APQ-01837-16) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* - Finance Code 001. The authors would like to acknowledge the Center of Microscopy at the *Universidade Federal de Minas Gerais* (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. The authors wish to acknowledge the *Programa de Pós-Graduação em Odontologia* at the *Universidade Federal de Minas Gerais* for the financial support for the language review.

References

- Arias, M.P., Maliza, A.G., Midena, R.Z., Graeff, M.S., Duarte, M.A. Andrade, F.B., 2016. Effect of ultrasonic streaming on intra-dental disinfection and penetration of calcium hydroxide paste in endodontic treatment. *J. Appl. Oral. Sci.* 24, 575-581. <https://doi.org/10.1590/1678-775720150553>
- Arola, D., Repogel, R.K., 2005. Effects of aging on the mechanical behavior of human dentin. *Biomaterials*, 26, 4051-4061. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.029>.
- Bajaj, D., Sundaram, N., Nazari, A., Arola, D., 2006. Age, dehydration and fatigue crack growth in dentin. *Biomaterials*, 27, 2507-2517. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.035>
- Bohrer, T.C., Fontana, P.E., Wandscher, V.F., Morari, V.H.C., Dos Santos, S.S., Valandro, L.F., et al., 2018. Endodontic sealers affect the bond strength of fiber posts and the degree of

conversion of two resin cements. *J. Adhes. Dent.*, 19, 1-8.

<https://doi.org/10.3290/j.jad.a40301>.

Buehler, M.J., 2006. Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12285-12290.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0603216103>.

Camargo, C.H., Bernardineli, N., Valera, M.C., de Carvalho, C.A., de Oliveira, L.D., Menezes, M.M., et al., 2006. Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. *Dent. Traumatol.* 22, 302-306. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a40301>.

Camargo, C.H.R., Siviero, M., Camargo, S.E.A., De Oliveira, S.H.G., Carvalho, C.A.T., Valera, M.C., 2007. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J. Endod.* 33, 422-426.

<https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.12.011>.

Costa, B.M., Iwamoto, A.S., Puppim-Rontani, R.M., Pascon, F.M., 2015. Comparative analysis of root dentin morphology and structure of human versus bovine primary teeth. *Microsc. Microanal.* 21, 689-694. <https://doi.org/10.1017/S1431927615000434>.

Cullen, J.K., Wealleans, J.A., Kirkpatrick, T.C., Yaccino, J.M., 2015. The effect of 8.25% sodium hypochlorite on dental pulp dissolution and dentin flexural strength and modulus. *J. Endod.* 41, 92092-4. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.01.028>.

Fischer, A., Wiechuła, D., Postek-Stefanska, L., Kwapulinski, J., 2009. Concentrations of metals in maxilla and mandible deciduous and permanent human teeth. *Biol. Trace. Elem. Res.* 132, 19-26. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8383-0>.

Galhano, G., de Melo, R.M., Valandro, L.F., Bottino, M.A., 2009. Comparison of resin push-out strength to root dentin of bovine- and human-teeth. *Indian. J. Dent. Res.*, 20, 332-336. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.57378>.

Gomes, B.P., Souza, S.F., Ferraz, C.C., Teixeira, F.B., Zaia, A.A., Valdrighi, L., et al., 2003. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int. Endod. J.* 36, 267-275. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00634.x>.

Guerreiro-Tanomaru, J.M., Chula, D.G., De Pontes Lima, R.K., Berbert, F. L., Tanomaru-Filho, M., 2012. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent. Traumatol.* 28, 320-323. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.01112.x>.

Hara, A.T., Queiroz, C.S., Paes Leme, A.F., Serra, M.C., Cury, J.A., 2003. Compare bovine and human teeth in caries progression, inhibition and biofilm composition. *Caries Res.* 37, 339-344. <https://doi.org/10.1159/000072165>.

Ivancik, J., Majd, H., Bajaj, D., Romberg, E., Arola, D., 2012. Contributions of aging to the fatigue crack growth resistance of human dentin. *Acta. Biomater.* 8, 2737-2746. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.046>.

Ivancik, J., Neerchal, N.K., Romberg, E., Arola, D., 2011. The reduction in fatigue crack growth resistance of dentin with depth. *J. Dent. Res.* 90, 1031-1036. <https://doi.org/10.1177/0022034511408429>.

Karan, K., Yao, X., Xu, C., Wang, Y., 2009. Chemical profile of the dentin substrate in non-carious cervical lesions. *Dent. Mater.* 25, 1205-1212.

<https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.04.006>.

Kato, M.T., Hannas, A.R., Leite, A.L., Bolanho, A., Zarella, B.L., Santos, J., et al., 2011.

Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.*, 45, 429-434. <https://doi.org/10.1159/000330525>.

Katz, J.L., Misra, A., Spencer, P., Wang, Y., Bumrerraj, S., Nomura, T., et al., 2007.

Multiscale mechanics of hierarchical structure/property relationships in calcified tissues and tissue/material interfaces. *Mater. Sci. Eng. A. Struct. Mater.* 27, 450-468. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.055>.

Kinney, J.H., Balooch, M., Marshall, S.J., Marshall, G.W. Jr, Weihs, T.P., 1996. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch. Oral. Biol.* 41, 9-13.

Kinney, J.H., Nalla, R.K., Pople, J.A., Breunig, T.M., Ritchie, R.O., 2005. Age-related transparent root dentin: mineral concentration, crystallite size, and mechanical properties.

Biomaterials. 26, 3363-3376. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.059>.

Lippert, F., Churchley, D., Lynch, R.J., 2015. Lynch, Effect of lesion baseline severity and mineral distribution on remineralization and progression of human and bovine dentin caries lesions. *Caries Res.* 49, 467-476. <https://doi.org/10.1159/000431039>.

Marshall, G.W.Jr., Marshall, S.J., Kinney, J.H., Balooch, M., 1997. Balooch, The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J. Dent.*, 25, 441-458.

Moreira, D.M., Almeida, J.F., Ferraz, C.C., Gomes, B.P., Line, S.R., Zaia, A.A., 2009.

Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J. Endod.* 35, 1023-1027. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.04.002>.

Nalla, R.K., Porter, A.E., Daraio, C., Minor, A.M., Radmilovic, V., Stach, E.A., et al., 2005.

Ultrastructural examination of dentin using focused ion-beam cross-sectioning and transmission electron microscopy. *Micron.*, 36, 672-680.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.004>.

Nazari, A., Bajaj, D., Zhang, D., Romberg, E., Arola, D., 2009. Aging and the reduction in fracture toughness of human dentin. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2, 550-559.

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2009.01.008>.

Oliver, W., Pharr, G., 1992. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J. Mater. Res.*, 7, 1564-1583. <https://doi.org/10.1557/JMR.1992.1564>.

Palo, R.M., Bonetti-Filho, I., Valera, M.C., Camargo, C.H., Camargo, S., Moura-Netto, C., et al., 2012. Quantification of peroxide ion passage in dentin, enamel, and cementum after internal bleaching with hydrogen peroxide. *Oper. Dent.* 37, 660-664.

<https://doi.org/10.2341/11-334-L>.

Panfilov, P., Zaytsev, D., Antonova, O.V., Alpatova, V., Kiselnikova, L.P., 2016. The difference of structural state and deformation behavior between teenage and mature human dentin. *Int. J. Biomater.* 2016, 2016:6073051. <https://doi.org/10.1155/2016/6073051>.

Porter, A.E., Nalla, R.K., Minor, A., Jinschek, J.R., Kisielowski, C., Radmilovic, V., et al., 2005. A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin. *Biomaterials*. 26, 7650-7660. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.05.011>.

Reitznerová, E., Amarasiriwardena, D., Kopcáková, M., Barnes, R.M., 2000. Determination of some trace elements in human tooth enamel. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 748-754.

Reyes-Gasga, J., Martínez-Piñero, E.L., Rodríguez-Álvarez, G., Tiznado-Orozco, G.E., García-García, R., Brès, E.F., 2013. XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 33, 4568-4574. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.014>.

Ryou, H., Romberg, E., Pashley, D.H., Tay, FR., Arola, D., 2015. Importance of age on the dynamic mechanical behavior of intertubular and peritubular dentin. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 42, 229-242. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.11.021>.

Salehi, H., Terrer, E., Panayotov, I., Levallois, B., Jacquot, B., Tassery, H., et al., 2013. Functional mapping of human sound and carious enamel and dentin with Raman spectroscopy. *J. Biophotonic.*, 6, 765-774. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200095>.

Schilke, R., Lisson, J.A., Bauss, O., Geurtsen, W., 2000. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch. Oral. Biol.* 45, 355-361. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(00\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(00)00006-6).

Schwartz, A.G., Pasteris, J.D., Genin, G.M., Daulton, T.L., Thomopoulos, S., 2012. Mineral distributions at the developing tendon enthesis. *PLoS One*, 7, 48630.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048630>.

Senawongse, P., Otsuki, M., Tagami, J., Mjor, I., 2006. Age-related changes in hardness and modulus of elasticity of dentine. *Arch. Oral. Biol.* 51, 457-463.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2005.11.006>.

Shinno, Y., Ishimoto, T., Saito, M., Uemura, R., Arino, M., Marumo, K., et al., 2016. Comprehensive analyses of how tubule occlusion and advanced glycation end-products diminish strength of aged dentin. *Sci. Rep.* 22, 19849. <https://doi.org/10.1038/srep19849>.

Soares, F.Z., Follak, A., da Rosa, L.S., Montagner, A.F., Lenzi, T.L., Rocha, R.O., 2016. Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Dent. Mater.* 32, 1385-1393.

<https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.09.019>.

Svensson, R.B., Hassenkam, T., Hansen, P., Peter Magnusson, S., 2010. Viscoelastic behavior of discrete human collagen fibrils. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 3, 112-115. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2009.01.005>.

Taube, F., Ylmén, R., Shchukarev, A., Nietzsche, S., Norén, J.G., 2010. Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents. *J. Dent.* 38, 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.09.006>.

Teruel Jde, D., Alcolea, A., Hernández, A., Ruiz, A.J., 2015. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch. Oral. Biol.* 60, 768-775. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.01.014>.

Tjäderhane, L., Carrilho, M.R., Tay, L.B.F.R., Pashley, D.H., 2012. Dentin basic structure and composition - an overview. *Endod Topics*, 20, 3–29. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00269.x>.

Toledano, M., Aguilera, F.S., Osorio, E., Cabello, I., Toledano-Osorio, M., Osorio, R., 2015. Functional and molecular structural analysis of dentine interfaces promoted by a Zn-doped self-etching adhesive and an in vitro load cycling model. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 50, 131–149. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.08.001>.

Vasiliadis, L., Darling, A.I., Levers, B.G., 1983. The amount and distribution of sclerotic human root dentine. *Arch. Oral. Biol.* 28, 645-649.

Wegehaupt, F.J., Widmer, R., Attin, T., 2010. Attin, Is bovine dentine an appropriate substitute in abrasion studies? *Clin. Oral. Investig.* 14, 201-205. <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0283-3>.

Xu, C., Wang, Y., 2011. Cross-linked demineralized dentin maintains its mechanical stability when challenged by bacterial collagenase. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 96, 242-248. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31759>.

Xu, C., Wang, Y., 2012. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. *Arch. Oral. Biol.* 57, 383-391. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.09.008>.

Xu, H., Zheng, Q., Shao, Y., Song, F., Zhang, L., Wang, Q., et al., 2014. The effects of ageing on the biomechanical properties of root dentine and fracture. *J. Dent.* 42, 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.025>.

Yamauchi, M., Sricholpech, M., 2012. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem.*, 52, 113-133. <https://doi.org/10.1042/bse0520113>.

Yassen, G.H., Platt, J.A., Hara, A.T., 2011. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J. Oral. Sci.* 53, 273-282.

<https://doi.org/10.2334/josnurd.53.273>.

Zaytsev, D., 2015. Correction of some mechanical characteristics of human dentin under compression considering the shape effect. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 49, 101-105.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.080>.

Zaytsev, D., Ivashov, A.S., Mandra, J.V., Panfilov, P., 2014. On the deformation behavior of human dentin under compression and bending. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 41, 83-

90. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.046>.

Ziskind, D., Hasday, M., Cohen, S.R., Wagner, H.D., 2011. Young's modulus of peritubular and intertubular human dentin by nano-indentation tests. *J. Struct. Biol.* 174, 23-30.

<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.09.010>.

Figure 1. Means and standard deviations for the number of dentinal tubules per mm^2 (tubule density) by group and root thirds.

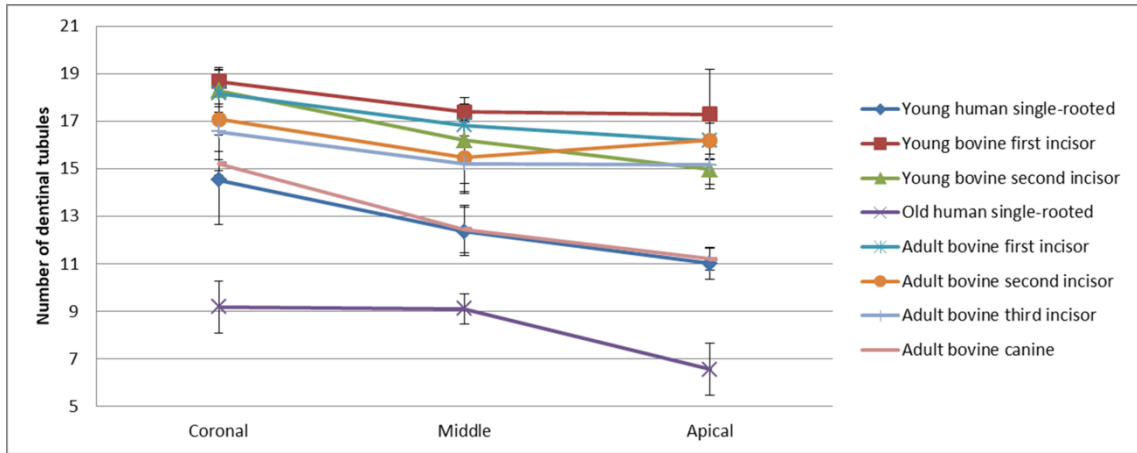


Figure 2. Means and standard deviations for the diameter of dentinal tubules by group and root thirds.

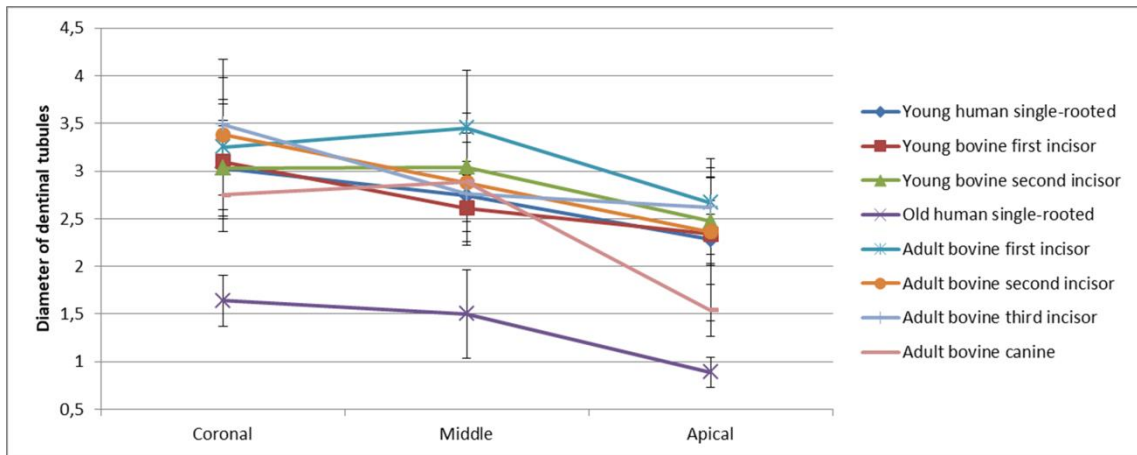


Figure 3. Means and standard deviations for the area of dentinal tubules by group and root thirds.

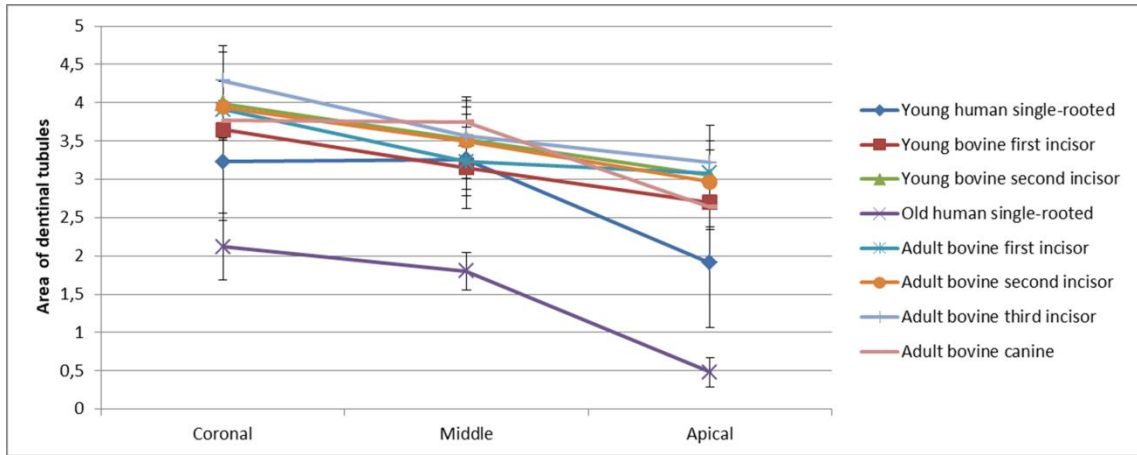


Figure 4. Representative SEM images (10,000X and 5,000X magnifications) of young human root dentin (1), old human root dentin (2), young bovine first incisor (3) and adult bovine canine (4) groups in coronal (CT), middle (MT) and apical (AT) thirds.

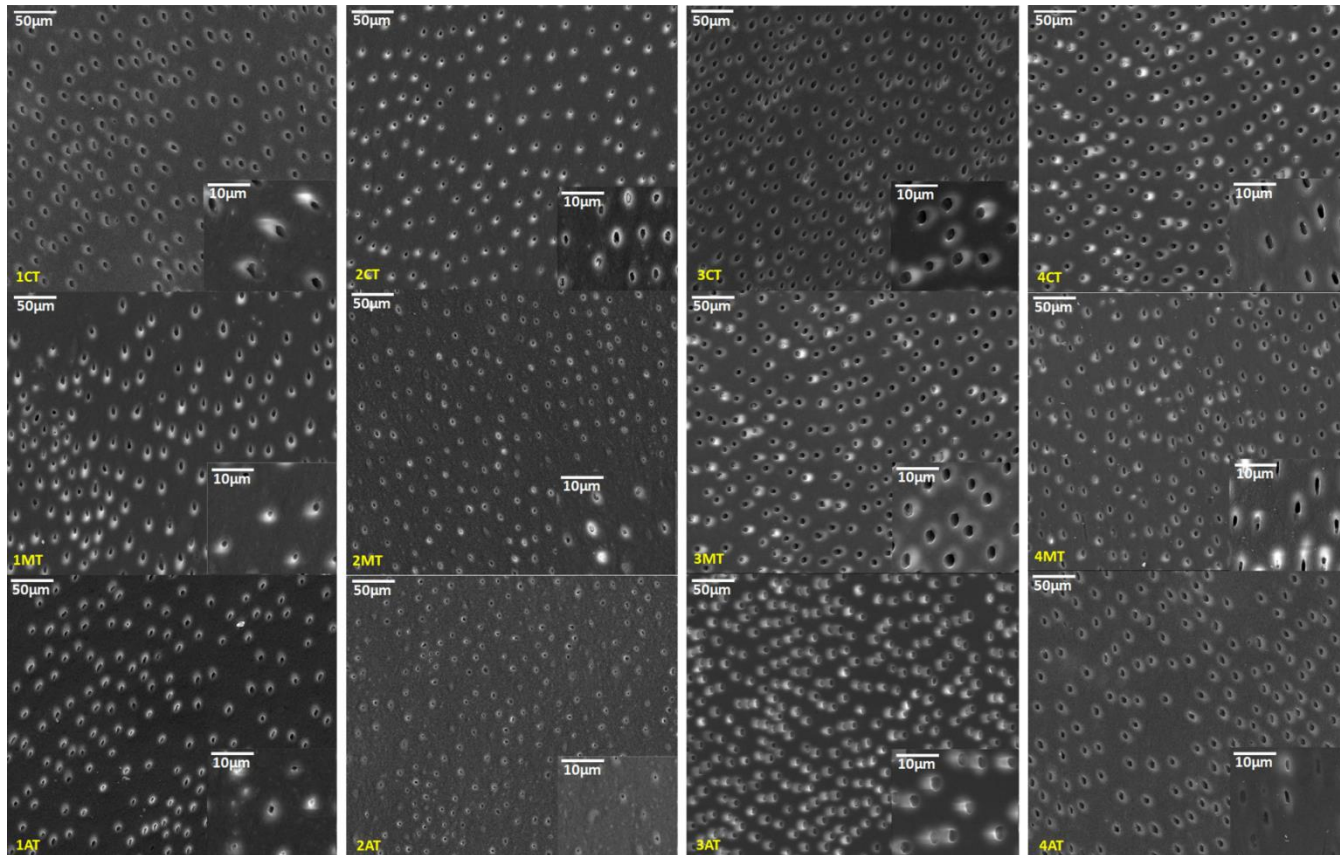


Table 1. Means and standard deviations of chemical elements percentages and Ca/P ratio from EDS and WDS for human and bovine root dentin with different age groups.

	<i>Root third</i>	Young human root dentin	Young bovine root dentin	Old human root dentin	Adult bovine root dentin
Calcium	<i>Coronal</i>	41.26 ± 2.01 ^{Aa}	40.92 ± 0.41 ^{Aa}	43.96 ± 1.97 ^{Ba}	41.14 ± 0.50 ^{Aa}
	<i>Middle</i>	41.28 ± 0.89 ^{Aa}	40.77 ± 0.74 ^{Aa}	43.13 ± 1.32 ^{Ba}	41.01 ± 1.06 ^{Aa}
	<i>Apical</i>	41.01 ± 0.94 ^{Aa}	40.41 ± 0.51 ^{Aa}	42.44 ± 1.09 ^{Ba}	40.96 ± 0.64 ^{Aa}
Phosphorus	<i>Coronal</i>	31.75 ± 1.60 ^{Aa}	31.23 ± 0.01 ^{Aa}	31.98 ± 0.61 ^{Aa}	31.47 ± 0.28 ^{Aa}
	<i>Middle</i>	31.21 ± 1.02 ^{Aa}	31.22 ± 0.00 ^{Aa}	31.55 ± 0.49 ^{Aab}	31.62 ± 0.40 ^{Aa}
	<i>Apical</i>	31.18 ± 0.93 ^{Aa}	31.22 ± 0.00 ^{Aa}	31.24 ± 0.02 ^{Ab}	31.27 ± 0.35 ^{Aa}
Sodium	<i>Coronal</i>	0.31 ± 0.01 ^{Aa}	0.16 ± 0.01 ^{Ba}	0.31 ± 0.00 ^{Aa}	0.45 ± 0.09 ^{Ca}
	<i>Middle</i>	0.31 ± 0.02 ^{Aa}	0.19 ± 0.08 ^{Ba}	0.31 ± 0.00 ^{Aa}	0.41 ± 0.08 ^{Aa}
	<i>Apical</i>	0.30 ± 0.00 ^{Aa}	0.17 ± 0.04 ^{Ba}	0.30 ± 0.06 ^{Aa}	0.40 ± 0.05 ^{Ca}
Magnesium	<i>Coronal</i>	1.39 ± 0.18 ^{Aa}	1.39 ± 0.32 ^{Aa}	1.40 ± 0.28 ^{Aa}	1.40 ± 0.23 ^{Aa}
	<i>Middle</i>	1.38 ± 0.23 ^{Aa}	1.39 ± 0.06 ^{Aa}	1.40 ± 0.16 ^{Aa}	1.39 ± 0.07 ^{Aa}
	<i>Apical</i>	1.37 ± 0.11 ^{Aa}	1.39 ± 0.11 ^{Aa}	1.39 ± 0.11 ^{Aa}	1.39 ± 0.11 ^{Aa}
Ca/P ratio	<i>Coronal</i>	1.30 ± 0.05 ^{Aa}	1.31 ± 0.01 ^{Aa}	1.37 ± 0.04 ^{Ba}	1.30 ± 0.02 ^{Aa}
	<i>Middle</i>	1.32 ± 0.06 ^{Aa}	1.30 ± 0.02 ^{Aa}	1.36 ± 0.04 ^{Aa}	1.29 ± 0.04 ^{Aa}
	<i>Apical</i>	1.31 ± 0.02 ^{ABa}	1.29 ± 0.01 ^{Aa}	1.35 ± 0.03 ^{Ba}	1.31 ± 0.03 ^{Aa}

*The different capital letters indicate significant differences in the comparison in the same lines. The different lowercase letters indicate significant differences in the comparison in the same columns.

Table 2. Mean and standard deviations of relative mineral concentration, gradient in mineral content, crystallinity band at 960 cm⁻¹, crystallinity band at 1070 cm⁻¹, amide I/amide III ratio, amideI/CH₂ ratio from FT-Raman for human and bovine root dentin with different age groups.

	<i>Root third</i>	Young human root dentin	Young bovine root dentin	Old human root dentin	Adult bovine root dentin
Relative mineral concentration	<i>Coronal</i>	2.14 ± 0.22 ^{Aa}	1.99 ± 0.18 ^{Aa}	2.82 ± 0.20 ^{Ba}	1.99 ± 0.13 ^{Aa}
	<i>Middle</i>	2.05 ± 0.29 ^{Aa}	2.02 ± 0.13 ^{Aa}	2.45 ± 0.22 ^{Bb}	1.98 ± 0.06 ^{Aa}
	<i>Apical</i>	1.98 ± 0.17 ^{Aa}	2.00 ± 0.14 ^{Aa}	2.34 ± 0.06 ^{Bb}	1.98 ± 0.13 ^{Aa}
Gradient in mineral content	<i>Coronal</i>	0.61 ± 0.03 ^{Aa}	0.54 ± 0.00 ^{Ba}	0.63 ± 0.01 ^{Aa}	0.55 ± 0.01 ^{Ba}
	<i>Middle</i>	0.60 ± 0.04 ^{Aa}	0.54 ± 0.00 ^{Aa}	0.63 ± 0.01 ^{Ba}	0.56 ± 0.02 ^{Aa}
	<i>Apical</i>	0.60 ± 0.03 ^{Aa}	0.54 ± 0.02 ^{Aa}	0.64 ± 0.01 ^{Ba}	0.57 ± 0.02 ^{Aa}
Crystallinity band at 960 cm⁻¹	<i>Coronal</i>	18.72 ± 0.71 ^{Aa}	19.65 ± 1.07 ^{Aa}	23.16 ± 0.80 ^{Ba}	19.53 ± 0.80 ^{Aa}
	<i>Middle</i>	18.67 ± 0.40 ^{Aa}	19.80 ± 0.73 ^{Ba}	22.07 ± 0.67 ^{Cb}	19.79 ± 0.81 ^{Ba}
	<i>Apical</i>	18.90 ± 0.66 ^{Aa}	19.84 ± 0.54 ^{Ba}	24.32 ± 0.20 ^{Cc}	19.90 ± 0.22 ^{Ba}
Crystallinity band at 1070 cm⁻¹	<i>Coronal</i>	38.24 ± 0.73 ^{Aa}	38.66 ± 0.17 ^{Aa}	38.93 ± 0.42 ^{Aa}	38.57 ± 0.35 ^{Aa}
	<i>Middle</i>	38.34 ± 0.60 ^{Aa}	38.75 ± 0.16 ^{Aa}	38.83 ± 0.41 ^{Aa}	38.35 ± 0.25 ^{Aa}
	<i>Apical</i>	38.43 ± 0.65 ^{Aa}	38.73 ± 0.27 ^{Aa}	38.95 ± 0.57 ^{Aa}	38.37 ± 0.34 ^{Aa}
Amide I/Amide III ratio	<i>Coronal</i>	1.47 ± 0.03 ^{Aa}	1.57 ± 0.03 ^{Ba}	1.23 ± 0.04 ^{Ca}	1.52 ± 0.01 ^{Ba}
	<i>Middle</i>	1.44 ± 0.02 ^{Ab}	1.56 ± 0.01 ^{Ba}	1.23 ± 0.02 ^{Ca}	1.54 ± 0.03 ^{Ba}
	<i>Apical</i>	1.43 ± 0.03 ^{Ab}	1.56 ± 0.02 ^{Ba}	1.07 ± 0.04 ^{Cb}	1.52 ± 0.04 ^{Ba}

Continue...

AmideI/CH₂ ratio	<i>Coronal</i>	1.15 ± 0.03 ^{Aa}	1.18 ± 0.02 ^{Aa}	0.97 ± 0.05 ^{Ba}	1.17 ± 0.01 ^{Aa}
	<i>Middle</i>	1.15 ± 0.03 ^{Aa}	1.18 ± 0.04 ^{Aa}	0.96 ± 0.04 ^{Ba}	1.17 ± 0.01 ^{Aa}
	<i>Apical</i>	1.13 ± 0.01 ^{Aa}	1.17 ± 0.01 ^{Ba}	0.88 ± 0.01 ^{Cb}	1.17 ± 0.16 ^{Ba}

*The different capital letters indicate significant differences in the comparison in the same lines. The different lowercase letters indicate significant differences in the comparison in the same columns.

Table 3. Means and standard deviations of nano-hardness (GPa) and elastic modulus (GPa) from nano-indentation, and compression strength (Mpa) and elastic modulus (GPa) from uniaxial compression for human and bovine root dentin with different age groups.

		<i>Root third</i>	Young human root dentin	Young bovine root dentin	Old human root dentin	Adult bovine root dentin
Nano-indentation	Nano-hardness	<i>Coronal</i>	0.85 ± 0.07 ^{Aa}	0.48 ± 0.06 ^{Ba}	1.51 ± 0.06 ^{Ca}	0.55 ± 0.09 ^{Ba}
		<i>Middle</i>	0.74 ± 0.36 ^{Aa}	0.44 ± 0.09 ^{Aa}	1.11 ± 0.13 ^{Bb}	0.43 ± 0.10 ^{Ab}
		<i>Apical</i>	0.55 ± 0.38 ^{Aa}	0.42 ± 0.16 ^{Aa}	0.93 ± 0.10 ^{Bc}	0.35 ± 0.15 ^{Aab}
	Elastic modulus	<i>Coronal</i>	12.95 ± 4.25 ^{Aa}	8.43 ± 1.78 ^{Ba}	15.12 ± 3.05 ^{Aa}	10.47 ± 1.15 ^{ABa}
		<i>Middle</i>	10.74 ± 4.40 ^{Aa}	8.28 ± 1.15 ^{Aa}	14.67 ± 1.23 ^{Ba}	9.80 ± 1.69 ^{Aa}
		<i>Apical</i>	9.75 ± 3.66 ^{Aa}	4.72 ± 2.09 ^{Ab}	13.40 ± 2.89 ^{Ba}	7.47 ± 3.50 ^{Aa}
Uniaxial compression	Compression strength	<i>Coronal</i>	446.32 ± 40.63 ^{Aa}	394.65 ± 35.58 ^{Aa}	531.69 ± 30.33 ^{Ba}	396.65 ± 47.69 ^{Aa}
		<i>Middle</i>	447.61 ± 45.50 ^{Aa}	396.05 ± 40.65 ^{Aa}	543.18 ± 39.55 ^{Ba}	543.18 ± 39.55 ^{Aa}
		<i>Apical</i>	451.24 ± 42.80 ^{Aa}	407.53 ± 10.10 ^{Aa}	629.95 ± 37.26 ^{Bb}	629.95 ± 37.26 ^{Aa}
	Elastic modulus	<i>Coronal</i>	4.21 ± 0.52 ^{Aa}	4.19 ± 0.40 ^{ABa}	5.13 ± 0.30 ^{Ba}	4.51 ± 0.37 ^{Aa}
		<i>Middle</i>	4.22 ± 0.27 ^{Aa}	4.00 ± 0.33 ^{Aa}	5.16 ± 0.20 ^{Ba}	4.15 ± 0.34 ^{Aa}
		<i>Apical</i>	4.08 ± 0.28 ^{Aa}	4.04 ± 0.18 ^{Aa}	5.26 ± 0.65 ^{Ba}	4.24 ± 0.22 ^{Ba}

*The different capital letters indicate significant differences in the comparison in the same lines. The different lowercase letters indicate significant differences in the comparison in the same columns.

Table 4. Means and standard deviations of flexural strength (MPa) and flexural modulus (GPa) from three-point flexural test for human and bovine root dentin with different age groups.

	Young human root dentin	Young bovine root dentin	Old human root dentin	Adult bovine root dentin
Flexural strength	556.84 ± 101.00 ^A	962.97 ± 160.71 ^B	290.37 ± 33.13 ^C	886.04 ± 98.68 ^B
Flexural modulus	15.10 ± 1.20 ^A	22.12 ± 1.01 ^B	12.67 ± 0.48 ^C	21.15 ± 1.64 ^B

*The different capital letters indicate significant differences in the comparison in the same line

4.2 Artigo 2

Aceito para publicação no periódico *The Journal of Adhesive Dentistry*, ISSN: 1757-9988.

Bond Strength of Resin Cements Fixing Fiber Posts to Human and Bovine Teeth of Different Ages

Francisco Ivison Rodrigues Limeira^a / Monize Ferreira Figueiredo de Carvalho^a / Viviane Valquíria do Nascimento^b / Caroline Christine Santa-Rosa^a / Monica Yamauti^c / Allyson Nogueira Moreira^d / Cláudia Silami Magalhães^d

^aPhD Student, Post-Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Study design, performed the experiments, conducted statistical analysis, wrote the manuscript, discussed the results and commented on the manuscript at all stages.

^bPhD Student, Post-Graduate Program in Physics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Performed the experiments, analyzed data, wrote the manuscript, discussed the results and commented on the manuscript at all stages.

^cAssociate professor, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Study design, data analysis, proofread the manuscript, discussed the results and commented on the manuscript at all stages.

^dProfessor, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Study design, data analysis, wrote the

manuscript, proofread the manuscript, discussed the results and commented on the manuscript at all stages.

Correspondence: Cláudia Silami Magalhães, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Telephone: +55 31 3409-2440; e-mail: silamic@yahoo.com

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the Center of Microscopy at the *Universidade Federal de Minas Gerais* (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. The authors wish to acknowledge the Brazilian Federal Agency for Supporting and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for the scholarship to Francisco Ivison Rodrigues Limeira (Finance Code 001) and the Foundation for Research Support of Minas Gerais (FAPEMIG) for grants (CDS-PPM-00507-15) and financial support for the language review (APQ-01837-16).

Abstract

Purpose: Evaluate the effect of human and bovine root dentin age on the bond strength of fiber posts fixed with resin cements. The degree of conversion (DC) of the resin cements in different root thirds also was evaluated.

Materials and Methods: Ninety-six single-rooted teeth were divided in accordance with the origin and age group: young human (20-30 years), old human (over 60 years), young bovine (24-36 months) and adult bovine (over 48 months). The teeth were endodontically treated, and fiber posts were cemented with resin cements (RelyX Ultimate and RelyX U200). After 24 hours, the teeth were sectioned perpendicularly and the push-out test was performed in a universal testing machine with a speed of 0.5 mm/min, until failure. One specimen of each third from each group (n=6) was selected, and the DC of the resin cements was analyzed by FT-Raman spectroscopy.

Results: For both resin cements, the young human root dentin group presented the highest bond strength values and the old human root dentin group presented the lowest values ($p < 0.05$). The bond strength values of bovine root dentin groups were not affected by aging ($p > 0.05$). For the DC of resin cements, there were differences among the root thirds ($p < 0.05$), with the lowest values observed in the apical third.

Conclusions: The bond strength values were higher in the young human root canal than in the bovine substrate, with a negative effect of aging in the human substrate. The DC of dual-curing resin cements decreased from the coronal to apical root thirds.

Keywords: root dentin, human tooth, bovine tooth, aging, bond strength, degree of conversion.

INTRODUCTION

Fiber posts are often used for increasing the retention of coronal restoration of structurally compromised non-vital teeth.^{41,69} Compared to more rigid post materials fiber posts have advantages as their elastic modulus, which is similar to that of dentin,² and ability to evenly distribute the stress along post, luting cement, and dentin.⁵⁹

The bond strength of fiber posts to the root canal has been the subject of several studies evaluating adhesive materials and cementation protocols.^{6,18,48,56} Human teeth are usually preferred in bond strength in vitro studies;^{24,30,50} however, healthy human teeth are difficult to obtain in sufficient quantities with adequate quality and standardization. Furthermore, when human tissues are involved in laboratorial studies, ethical aspects demand attention and are time consuming.^{12,17,65}

Bovine teeth have been used for a long time as an alternative to human teeth for bonding tests on root dentin,^{18,48,49} mainly due to the similar morphological and physicochemical properties, ease of acquisition and possibility of standardization, reducing the substrate bias. Two recent systematic reviews and meta-analyzes compared human and bovine teeth and concluded that bovine teeth can provide a reliable substitute for human teeth in bond strength studies of adhesive systems to dental substrates.^{13,57} However, of the articles included in these reviews, only one study²⁴ compared the bond strength of fiber posts to human and bovine root dentin with a higher push-out bond strength for the human substrate. Nevertheless, in the previous study, sample size was not calculated, tooth age was not standardized and there was no root canal filling nor bond strength evaluation per root third.

Dentin properties are found to be affected by age due to its dynamic characteristics.^{1,3,52} After the third decade of life, there is a transition in the microstructure of dentin, in which the tubules become gradually filled with inorganic material.²⁹ After a significant number of tubules have been filled, the tissue is considered sclerotic, resulting in

an increased mineral content.²⁹ Despite increased dentin calcification with age, adhesion studies have not shown an obvious association between coronary dentin age and the bonding ability of dentin adhesives,^{9,42,43,46} without studies evaluating the effect of age on adhesion to root dentin.

Dentin bonding can be accomplished with etch-and-rinse (dentin acid etching), self-etch (functional monomers simultaneously demineralize and infiltrate the substrate) and universal adhesive systems (that can be used with both etch-and-rinse and self-etch approaches).⁴⁹ The primary mechanism of micromechanical retention of etch-and-rinse adhesives is the hybridization of dentin. Hydrophilic resin monomers infiltrate the demineralized dentin encapsulating the exposed dentin matrix and forming the so-called hybrid layer. With self-etch adhesive systems the incorporation and/or partial demineralization of smear layer results in a thin and irregular hybrid layer. The bonding mechanism of self-etch adhesives has been linked to an additional chemical bond to dentin.⁴ The chemical and morphological characteristics of the adhesive-tooth interface and the quality of the hybrid layer depend to a large extent on the interaction between functional monomers and the tooth substrate.⁶⁹ Generally, self-adhesive dual curing resin cements are, by essence, a self-etching material during the initial stages of its chemical reaction and have the advantage to be used in a single step.³⁴

Resin cements and fiber posts are good choices for restoration of endodontically treated teeth.¹⁶ However, clinical studies have shown that post fractures and decementation are the most frequent types of failure observed.^{23,40,53} Several factors may influence the bond strength of root canal posts, including the canal depth, type of resin cement used, and dentinal substrate.¹⁹ Thus, it is important to investigate other factors that may influence the bond strength of fiber posts in studies comparing different dentin substrates.

The purpose of this *in vitro* study was to evaluate the effect of human and bovine root dentin age on the bond strength of fiber posts fixed with resin cements. We also evaluated the degree of conversion (DC) of the resin cements in different root thirds. The null hypotheses tested were as follows: 1) age of teeth has no effect on the bond strength of fiber posts luted with dual-curing resin cements in the human and bovine root canal; 2) there is no difference in the DC of dual-curing resin cements among the root thirds.

MATERIAL AND METHODS

This study was conducted after receiving approval from the Ethics Committee in Research (protocol 1.803.933) and Ethics Committee on the Use of Animals (protocol 372/2016), Federal University of Minas Gerais.

Sample Selection and Root Canal Preparation

The sample size estimation was based on the standard magnitude of the effect,⁷ where the sample size = $16 \div SMF^2$. The test power was 0.80 ($\beta = 0.2$), and α (bilateral) was 0.05. The results of the study by Galhano et al.²⁴ were considered for the calculation. The calculation indicated a sample size of 10 teeth per group, which was increased by 20% to compensate for possible losses (12 teeth), resulting in a total of 96 teeth.

Permanent healthy and single-rooted human teeth (incisors and premolars), extracted for periodontal or orthodontic reasons, divided in accordance with age group were selected: young (20 to 30 years) and old (over 60 years). Healthy single-rooted bovine teeth with standardized dimensions were selected and divided in accordance with the age group: young (24 to 36 months) adult (over 48 months). Animals with up to four permanent incisor teeth are considered young (24 to 36 months) and with eight teeth are considered adults (over 48 months). To standardize the diameter of the root canal roots in which it was possible to

penetrate 1/3 of the active tip of Whitepost DC3 drill (FGM Produtos Odontológicos; Joinville, SC, BR) were selected. The teeth were clean, disinfected in 0.1% thymol solution for 1 day and kept frozen until preparation. The crowns were sectioned at the cement-enamel junction with a diamond disk (KG Sorensen; Cotia, SP, BR) using a low-speed handpiece under air/water cooling. The roots length was standardized at 15.0 mm.

The root canals were instrumented with rotatory files (ProTaper Universal System, Dentisply Maillefer; Ballaigues, SWZ) and irrigated between each filing with 2.5% NaOCl (Asfer Indústria Química Ltda.; São Caetano do Sul, SP, BR). The smear layer was removed with 2 mL of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (Biodinâmica; Iporã, PR, BR) for 5 minutes. The root canals were filled with gutta percha points (Dentisply Maillefer; Ballaigues, SWZ) using the cold lateral condensation technique and sealed with an epoxy resin-based sealer (AH Plus, Dentisply Maillefer; Ballaigues, SWZ). Next, the roots were stored in distilled water at 37 °C for 7 days. An 11-mm post space was prepared with the rotary instruments provided by the post manufacturer (Whitepost DC3 FGM Produtos Odontológicos; Joinville, SC, BR), maintaining a 4-mm apical filling.

Fiber Post Cementation

Initially, 96 roots were randomly divided into 4 groups (n=24) according to the origin and age of the root dentin. Subsequently, each group containing 24 roots was divided into 2 groups (n=12) according to the resin cements: dual-curing resin cement (RelyX Ultimate, 3M Co.; St. Paul, MN, USA) and self-adhesive dual-curing resin cement (RelyX U200, 3M Co.; St. Paul, MN, USA). The fiber posts were fixed according to the cementation protocol described in Table 1. After cementation, the specimens were stored in a humid environment at 37 °C for 24 hours before being prepared for mechanical testing.

Push-out Bond Strength Test

The roots were fixed in acrylic plates and sectioned transversely with a precision saw (IsoMet 1000, Buehler; Lake Bluff, IL, EUA) to obtain 2 specimens of each root third with a thickness of 1.0 mm. The first section of each root, with a thickness of 0.5 mm, was discarded.

The thickness of the specimens was measured with a digital caliper (Mitutoyo Series 500, Mitutoyo; Suzano, SP, BR). The specimens were positioned on a metal base with a 2.0-mm-diameter central hole. A plunger with a 1.0-mm diameter tip was adapted to the testing machine and positioned on the specimen so that it only touched the post, without contacting the canal walls. The load was applied from the most apical surface in the coronal direction. The test was performed in a universal testing machine (EZ-LX Long-Stroke Model, Shimadzu; Kyoto, JPN) with a 5 N load cell at a speed of 0.5 mm/min. The maximum load at failure was recorded in Newtons (N) and converted into Megapascals (MPa) by dividing the load applied by the bonded area (A), calculated using the following formula: $A = \pi(R_2 + R_1) [h^2 + (R_2 - R_1)^2]^{0.5}$, where π is a constant value of 3.14, R1 and R2 are the smallest and largest radius, respectively, of the cross-sectioned tapered post, and h is the thickness of the section.

Failure Mode Analysis

All fractured specimens were evaluated by stereomicroscopy (Stereo Discovery.V8, Carl Zeiss AG; Oberkochen, BW, GER) at $\times 40$ magnification. The mode of failure was classified as follows: adhesive, if it occurred at the dentin-resin cement adhesive interface; mixed, if it involved both the interface and the material; cohesive in material, if it occurred in the material; or cohesive in the dentin, if it occurred in the dental substrate.

Cementation Line Analysis

To analyze the cementation line, 3 representative specimens for each experimental group were obtained. They were included in orthophthalic resin (Cristal 5061; Belo Horizonte, MG, BR), cured for up to 24 h and polished with 600- and 1,000-grit silicon carbide sandpaper (Norton; Guarulhos, SP, BR) and 1,200, 2,000, and 2,500-grit Al₂O₃ sandpaper (Carborundum Abrasives; Recife, PE, Brazil). The samples underwent superficial demineralization with 50% phosphoric acid for 3 s, were rinsed in running water for 1 min, and were deproteinated by immersion in 2.5% NaOCl for 10 min. Subsequently, the samples were washed three times with distilled water and immersed in solutions of increasing ethanol concentrations (25, 50, 75, 95, and 100%) for 20 min per solution. The immersion in 100% ethanol solution was repeated three times for 10 min each.⁴⁷ The samples were dried for 24 h at 37 °C with silica gel, mounted on aluminium stubs, coated with a carbon layer (15 nm thick) and the images were obtained by low-vacuum scanning electron microscopy (SEM) (FEG – FEI, FEG Quanta 200F; Hillsboro, OR, EUA) at ×50, ×500, and ×1000 magnification.

Degree of Conversion

One specimen of each third from each group (n=6) was selected 24 hours after fiber post cementation, and the DC of the resin cements was analyzed by FT-Raman spectroscopy (HYPERION IR microscope, Vertex 70; Bruker, Ettlingen, GER) with a germanium diode detector cooled with liquid nitrogen. The cementation line of each specimen was excited with an air-cooled Nd:YAG laser ($\lambda = 1064$ nm) with a power of 1000 mW. The spectral resolution was set to 4 cm⁻¹, and one spectrum for each measurement was accumulated with 700 scans. For each specimen, spectra were obtained from 3 random areas, defined as ×10 magnification, and the mean of the measures was used to represent the DC.

Raman data were processed and baseline-corrected using software (OriginLab Corporation; Northampton, MA, USA). Raman spectra were obtained as follows: the 1637 cm^{-1} peak indicates aliphatic C=C double bonds of the cement, and the 1609 cm^{-1} peak represents aromatic C=C bonds (internal reference). The spectra of the unpolymerized resin cements were obtained as a reference. The DC of the resin cement was calculated using the following equation: $DC (\%) = 100 \times [1 - (R_{\text{Polymerized}}/R_{\text{Non-polymerized}})]$, where R is the ratio of the aliphatic and aromatic peak areas at 1637 cm^{-1} and 1609 cm^{-1} in polymerized and unpolymerized resin cements.⁶¹

Statistical Analysis

The normal distribution and homogeneity of variances of the push-out bond strength and DC values were evaluated using the Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) and Levene tests ($p > 0.05$). The effects of the origin, age range and third root, and the interaction of these factors in the mean bond strength and DC, were verified by 3-way ANOVA and the Tukey honest significant differences post hoc test. Comparisons of the DC between the resin cements in each root third were performed by Student's t-test.

All statistical analyses were performed using the statistical software (SPSS 20; Statistical Product and Service Solutions) at a 5% level of significance.

RESULTS

Bond Strength

For both resin cements bond strength, 3-way ANOVA showed significant effects for the factors age ($p = 0.00$), origin ($p = 0.00$) and third root ($p = 0.00$). For RelyX Ultimate ($p = 0.99$) and RelyX U200 ($p = 0.09$) the interactions among the three factors were not

significant. Significant interactions were observed between factors origin and age for both resin cements ($p=0.00$).

For the resin cement RelyX Ultimate, the young human root dentin presented the highest values of bond strength and did not differ significantly from young bovine root dentin in the coronal and apical thirds ($p>0.05$). Old human root dentin presented the lowest values of bond strength and differed significantly from the other groups in each root third ($p<0.05$). The age groups of bovine dentin did not differ in relation to the bond strength values ($p>0.05$), except in the apical third. The mean bond strength showed a significant decrease in the coronal/apical direction ($p<0.05$), with the exception of old human root dentin (Table 2).

The results showed that for fiber posts fixed with RelyX U200, old human root dentin presented the lowest bond strength values, while young human root dentin presented the highest values, differing significantly from the other groups in all root thirds ($p<0.05$). No significant difference was observed in the bond strength of bovine dentin among the different age groups ($p>0.05$). For all groups, the mean bond strength among the root thirds decreased significantly in the coronal, middle and apical regions ($p <0.05$) (Table 2).

Failure Mode Analysis

For the resin cement RelyX Ultimate the old human root dentin group had a higher frequency of adhesive failure. For the resin cement RelyX U200, independently of the experimental group and the third radicular, the mixed failure mode was the most prevalent (Table 3).

Cementation Line Analysis

The SEM showed continuous cementation lines for both resin cements in each experimental group (origin and age) in all root thirds. For the resin cement RelyX Ultimate,

young bovine root dentin showed a greater amount of resin tags, whereas old human dentin showed a decreased the number of resin tags and a less evident hybrid layer compared with young human dentin (Figure 1). For U200, the cement line was juxtaposed to the dentin surface in all groups, and no hybrid layer or resin tags were observed (Figure 2).

Degree of Conversion

For the DC of resin cements, 3-way ANOVA showed significant effects only for the factor third root ($p=0.001$). There was no significant interaction between factors ($p>0.05$). The DC values for the resin cements as a function of the thirds of root dentin are shown in Table 4. The Tukey test results revealed significant differences among the root thirds for both resin cements ($p=0.000$). The coronal third presented the highest DC values, while the lowest values were observed in the apical third. The RelyX Ultimate showed higher DC values compared with RelyX U200 in all root thirds ($p<0.05$).

DISCUSSION

Although the principles of adhesion to coronal dentin can also be applied to root dentin, specific variations in dentin structure, local morphology, and physiological shifts due to aging and/or pathological processes play important roles in the performance of dental adhesives and the quality of the resultant bonded interfaces.¹⁴ The results of this study showed that age had an effect on the bond strength of fiber posts cemented in the human root canal, rejecting the first null hypothesis.

The rationale of using self-etch adhesives and self-adhesive cements is based on the same principle of dental demineralization and simultaneous infiltration by methacrylate monomers. Self-etch adhesives could interact with dentin in two ways: micromechanically and chemically.⁶² The micromechanical interaction occurs due to in situ polymerization of the

monomers that infiltrate into the dentin. Additional chemical interactions occur due to ionic bonding between functional monomers of adhesives and calcium in the residual hydroxyapatite.^{36,62} With different chemical structures, the functional monomers containing acidic groups may interact quite differently with hydroxyapatite and thus dentin substrate, and even small changes may influence their polarity and consequently, influence their interaction behavior and bonding efficacy.^{22,67} The old intertubular dentin presents higher Ca concentration and higher Ca-to-P ratio than young human root dentin.⁶⁴ Aged-induced microstructural changes cause spatial variations in the intrinsic properties of root dentin with morphological and chemical alterations that may modify the results of acid etching or resin monomer infiltration and therefore, adversely affect the adhesion process.^{26,31,64} However, few studies have investigated the effects of tooth age on coronal dentin bond strength,^{9,42,43,46} with a gap in knowledge concerning the effect of age on adhesion to root dentin, especially on the chemical characterization of resin-dentin bond.

Self-adhesive resin cements do not require that a bonding agent or dental adhesive before cementation.³⁷ Even though micromechanical retention and chemical interaction between acidic groups and hydroxyapatite are expected, self-adhesive resin cements interact only superficially with dental hard tissues.²⁰ The ability of the acidic monomers to demineralize dentin and dissolve the thick smear layer inside the root canal seems to be negligible due to the rapid rise in pH through reactions between phosphoric acid groups and alkaline filler.^{8,51} Previous studies demonstrated a hydroxyapatite-depleted collagen layer remaining between a self-adhesive resin cement and the unaffected dentin, and the adhesion mechanism different from the self-etch adhesive for which a distinct mineralization and hybridization at the interface was observed.^{28,62} Our SEM images showed similar results with a greater amount of resin tags in self-etch Universal adhesive and RelyX Ultimate in young bovine dentin and a few resin tags and less evident hybrid layer compared with young human

dentin. For RelyX U200, the cement line was juxtaposed to the dentin surface in all groups, and no hybrid layer or resin tags were observed.

The bond strength values of bovine root dentin were not affected by aging. This finding may be justified by the short time difference between the young and adult age groups, with absence of morphological and chemical changes in dentin. The life expectancy of bovine in nature is 15 to 20 years, however in the meat and milk industry the life expectancy of these animals is only 18 months and 48 months, respectively. Thus, due to the difficulty of obtaining a sample of old bovine teeth, we opted for the analysis of young and adult bovine teeth.

The origin of root dentin had an effect on the bond strength values. Young human root dentin presented higher bond strength than bovine root dentin of both ages. These findings are in accordance with the study reported by Galhano et al.,²⁴ in which a higher bond strength of human root dentin was observed compared with bovine root dentin. However, the authors attributed this result to the standardization of the specimen length, as all three regions of the human root dentin were used in the test, while only the middle and apical root thirds of the bovine teeth were used. Thus, the human root could have had a greater push-out bond strength because the cervical third exhibits greater bond strength values than the middle and apical thirds.^{25,38}

In addition to the morphological differences, bovine root has a greater number of dentin tubules than human root in all root thirds.^{12,17} Consequently, bovine root dentin has a smaller area of intertubular dentin. Dentin adhesion depends on the creation of pathways for monomers infiltration¹⁴ A greater number of tubules can provide a higher intrinsic humidity that can affect adhesion by diluting or precipitating the adhesive agent.⁴⁴ Thus, a larger number of dentin tubules and the reduced area of intertubular dentin available for adhesion in bovine root dentin may have contributed to the decreased bond strength. A higher tensile

strength for human root dentin has also been associated with low densities of dentinal tubules.³³

Although a direct comparison of resin cements was not the aim of this study, the low bond strength values of RelyX U200 could be attributed to the low diffusion of the resin cement in the demineralized dentin substrate and to the poor formation of a hybrid layer and resin tags. Differences in the bonding mechanisms of the resin cements used may have resulted in higher bond strength values for fiber posts fixed with RelyX Ultimate associated with the universal adhesive system. In our study, Single Bond Universal (mild universal adhesive) was used as a 1-step self-etch adhesive. This adhesive system contains the 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (MDP) monomer. The addition of MDP to self-etch adhesive systems allows the establishment of a chemical bond between phosphate groups and residual hydroxyapatite crystals on the dentin collagen scaffold, and enhances adhesive-dentin hybridization due to the superior diffusion of the adhesive, although the typical resin tags will only be formed when using strong self-etching adhesives. This chemical bond appears to reduce hybrid layer degradation over time and is more stable in water compared with other functional monomers.^{37,63,68}

Another factor that may influence the bond strength of fiber posts to different dentin substrates is the DC of the resin cements used. In the present study, the DC of both resin cements was significantly different in the root thirds. Thus, the second null hypothesis tested was rejected.

Some factors that may interfere with the DC of resin cements are the material composition (monomers and other components of the activation system), possible inadvertent interactions between the bonding system and the cement, characteristics of the post to be fixed (optical properties and length) and characteristics of the photo activation step.⁵⁸ The coronal third presented the highest DC values, while the lowest values were observed in the apical

third. Even with the use of translucent glass fiber posts, light transmission through the root canal may have decreased in the apical region, compromising the chemical reaction and decreasing DC.^{15,54} The RelyX Ultimate showed higher DC values compared with RelyX U200. Although the DC is composition-dependent and a careful comparison between materials is important, differences between the resin cements (dual-curing and self-adhesive) were observed. A plausible explanation may be the triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA) content in each resin cement. RelyX Ultimate likely has a higher content of the diluent monomer compared with the more viscous RelyX U200. This increased viscosity of self-adhesive cements may affect the ability of radicals to migrate and continue the setting reaction, lowering the DC values.²¹ The lowest DC presented by RelyX U200 may also be associated with the presence of acidic monomers in its composition. Acidic monomers have been shown to negatively affect the DC of dual-curing materials, especially in their self- but also in their dual-curing mode of polymerization, since they seem to interact chemically with the amine initiator.⁶⁰

Thermocycling and water storage are well-accepted artificial aging protocols for simulation of clinical oral environment.²⁷ Although, it was reported that push-out bond strengths of fiber posts to root dentin is affected by thermocycling and water storage,^{7,27,55} the effect of aging was not an independent variable and it represents a limitation of this study.

In view of the lack of studies comparing the resistance of fiber posts to human and bovine root dentin, future studies are necessary to correlate the immediate and long-term bond strength values with other factors such as morphological and chemical aspects of these substrates, different cementation protocols and chemical interactions of the dentin and adhesive materials.

CONCLUSIONS

Considering the limitations of this investigation, the following conclusions were drawn:

1. Age has negative effect on the bond strength of cemented fiber posts in the human root canal.
2. The bond strength of cemented fiber posts in the human root canal is higher than in the bovine substrate.
3. DC of dual-curing resin cements decreases from coronal to apical root thirds.

Thus, studies that use bovine root dentin in substitution in humans for bonding tests should consider the effect of origin and age on bond strength values of these dental substrates.

CLINICAL RELEVANCE

To guide the selection of ideal adhesive material for posts cementation, the origin and age of the root substrate used in bond strength tests should be considered since bovine teeth do not reproduce the conditions of human teeth. Also, the degree of conversion of the resin cements decreases from coronal to apical root thirds which may affect their mechanical properties.

REFERENCES

1. Arola D, Reprogl RK. Effects of aging on the mechanical behavior of human dentin. *Biomaterials* 2005; 26:4051-61.
2. Assif D. Biomechanical considerations in restoring endodontically treated teeth *J Prosthet Dent* 1994; 71:565-67.
3. Bajaj D, Sundaram N, Nazari A, Arola D. Age, dehydration and fatigue crack growth in dentin. *Biomaterials* 2006; 27:2507-17.

4. Bedran-Russo A, Leme-Kraus AA, Vidal CMP, Teixeira EC. An overview of dental adhesive systems and the dynamic tooth-adhesive interface. *Dent Clin North Am* 2017; 61:713-31.
5. Bertassoni LE, Stankoska K, Swain MV. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. *Micron* 2012; 43:229-36.
6. Bitter K, Maletic A, Neumann K, Breschi L, Sterzenbach G, Taschner M. Adhesive durability inside the root canal using self-adhesive resin cements for luting fiber posts. *Oper Dent* 2017; 42:167-76.
7. Bitter K, Meyer-Lueckel H, Priehn K, Kanjuparambil JP, Neumann K, Kielbassa AM. Effects of luting agent and thermocycling on bond strengths to root canal dentine. *Int Endod J* 2006; 39:809-18.
8. Bitter K, Paris S, Pfuertner C, Neumann K, Kielbassa AM. Morphological and bond strength evaluation of different resin cements to root dentin. *Eur J Oral Sci* 2009; 117:326-33.
9. Brackett WW, Tay FR, Looney SW, Ito S, Haisch LD, Pashley DH. The effect of subject age on the microtensile bond strengths of a resin and a resin-modified glass ionomer adhesive to tooth structure. *Oper Dent* 2008; 33:282-6.
10. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008; 24:90-101.
11. Browner WS, Newman TB, Hulley SB. Estimando o tamanho de amostra e o poder estatístico: Aplicações e exemplos. In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG,

Newman TB. Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica. 3th ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. p.384.

12. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, De Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 2007; 33:422-6.

13. Carvalho MFF, Leijôto-Lannes ACN, Rodrigues MCN, Nogueira LC, Ferraz NKL, Moreira AN, Yamauti M, Zina LG, Magalhães CS. Viability of bovine teeth as a substrate in bond strength tests: a systematic review and meta-analysis. *J Adhes Dent* 2018; 20:471-79.

14. Carvalho RM, Tjäderhane L, Manso AP, Carrilho MR, Carvalho CAR. Dentin as a bonding substrate. *Endod Topics* 2012; 21:62-88.

15. Cerutti F, Acquaviva PA, Gagliani M, Ferrari M, Mangani F, Depero LE, Cerutti A. Degree of conversion of dual-cure resins light-cured through glass - fiber posts. *Am J Dent* 2011; 24:8-12.

16. Cheung W. A review of the management of endodontically treated teeth. Post, core, and the final restoration. *J Am Dent Assoc* 2005;136:611-9.

17. Costa BM, Iwamoto AS, Puppim-Rontani RM, Pascon FM. Comparative analysis of root dentin morphology and structure of human versus bovine primary teeth. *Microsc Microanal* 2015; 21:689-94.

18. Daleprane B, Pereira CN, Bueno AC, Ferreira RC, Moreira AN, Magalhães CS. Bond strength of fiber posts to the root canal: Effects of anatomic root levels and resin cements. *J Prosthet Dent* 2016; 116:416-24.

19. Daleprane B, Pereira CNB, Oréface RL, Bueno AC, Vaz RR, Moreira AN, Magalhães CS. The effect of light-curing access and different resin cements on apical bond strength of fiber posts. *Oper Dent* 2014; 39:E93-100.
20. De Munck J, Vargas M, Van Landuyt K, Hikita K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bonding of an auto-adhesive luting material to enamel and dentin. *Dent Mater* 2004; 20:963-71.
21. Di Francescantonio M, Aguiar TR, Arrais CA, Cavalcanti AN, Davanzo CU, Giannini M. Influence of viscosity and curing mode on degree of conversion of dual-cured resin cements. *Eur J Dent* 2013; 7:81-5.
22. Feitosa VP, Ogliari FA, Van Meerbeek B, Watson TF, Yoshihara K, Ogliari AO, Sinhoreti MA, Correr AB, Cama G, Sauro S. Can the hydrophilicity of functional monomers affect chemical interaction? *J Dent Res* 2014; 93:201-6.
23. Ferracane JL, Stansbury JW, Burke FJ. Self-adhesive resin cements - Chemistry, properties and clinical considerations. *J Oral Rehabil* 2011; 38:295-314.
24. Galhano G, De Melo RM, Valandro LF, Bottino MA. Comparison of resin push-out strength to root dentin of bovine- and human-teeth. *Indian J Dent Res* 2009; 20:332-6.
25. Gaston BA, West LA, Liewehr FR, Fernandes C, Pashley DH. Evaluation of regional bond strength of resin cement to endodontic surfaces. *J Endod* 2001; 27:321-4.
26. Giannini M, Chaves P, Oliveira MT. Effect of tooth age on bond strength to dentin. *J Appl Oral Sci* 2003; 11:342-7.

27. Hashemikamangar SS, Hasanitabatabaee M, Kalantari S, Gholampourdehaky M, Ranjbaromrani L, Ebrahimi H. Bond strength of fiber posts to composite core: Effect of surface treatment with Er,Cr:YSGG laser and thermocycling. *J Lasers Med Sci* 2018; 9:36-42.
28. Hikita K, Van Meerbeek B, De Munck J, Ikeda T, Van LanduytK, Maida T, Lambrechts P, Peumans M. Bonding effectiveness of adhesive lutingcements to enamel and dentin. *Dent Mater* 2007; 23:71-80.
29. Kinney JH, Nalla RK, Pople JA, Breunig TM, Ritchie RO. Age-related transparent root dentin: Mineral concentration, crystallite size, and mechanical properties. *Biomaterials* 2005; 26:3363-76.
30. Krifka S, Börzsönyi A, Koch A, Hiller KA, Schmalz G, Friedl KH. Bond strength of adhesive systems to dentin and enamel - human vs. bovine primary teeth in vitro. *Dent Mater* 2008; 24:888-94.
31. Lopes GC, Vieira LC, Araújo E, Bruggmann T, Zucco J, Oliveira G. Effect of dentin age and acid etching time on dentin bonding. *J Adhes Dent* 2011; 13:139-45.
32. Manhart J, Chen H, Hamm G, Hickel R. Buonocore memorial lecture. Review of the clinical survival of direct and indirect restorations in posterior teeth of the permanent dentition. *Oper Dent* 2004; 29:481-508.
33. Mannocci F, Pilecki P, Bertelli E, Watson TF. Density of dentinal tubules affects the tensile strength of root dentin. *Dent Mater* 2004; 20:293-6.
34. Manso AP, Carvalho RM. Dental cements for luting and bonding restorations: self-adhesive resin cements. *Dent Clin North Am* 2017; 61:821-834.

35. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent* 1997; 25:441-58.
36. Monticelli F, Osorio R, Mazzitelli C, Ferrari M, Toledano M. Limited decalcification/diffusion of self-adhesive cements into dentin. *J Dent Res* 2008; 87:974-9.
37. Mine A, De Munck J, Cardoso MV, Van Landuyt KL, Poitevin A, Van Ende A, Matsumoto M, Yoshida Y, Kuboki T, Yatani H, Van Meerbeek B. Dentin-smear remains at self-etch adhesive interface. *Dent Mater* 2014; 30:1147-53.
38. Mitsui FH, Marchi GM, Pimenta LA, Ferraresi PM. In vitro study of fracture resistance of bovine-roots using different intraradicular post systems. *Quintessence Int* 2004; 35:612-6.
39. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982; 16:265-73.
40. Naumann M, Koelpin M, Beuer F, Meyer-Lueckel H. 10-year survival evaluation for glass-fiber-supported postendodontic restoration: a prospective observational clinical study. *J Endod* 2012; 38:432-5.
41. Naumann M, Neuhaus KW, Kolpin M, Seemann R. Why, when, and how general practitioners restore endodontically treated teeth: a representative survey in Germany. *Clin Oral Investig* 2016; 20:253-59.
42. Oliveira GC, Oliveira GM, Ritter AV, Heymann HO, Swift EJ, Yamauchi M. Influence of tooth age and etching time on the microtensile bond strengths of adhesive systems to dentin. *J Adhes Dent* 2012; 14:229-34.
43. Ozer F, Sengun A, Ozturk B, Say EC, Tagami J. Effect of tooth age on microtensile bond strength of two fluoride-releasing bonding agents. *J Adhes Dent* 2005; 7:289-95.

44. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent* 1997; 25:355-72.
45. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011; 27:1-16.
46. Perdigão J, Sezinando A, Monteiro PC. Effect of substrate age and adhesive composition on dentin bonding. *Oper Dent* 2013; 38:267-74.
47. Pereira CNB, Daleprane B, Barbosa PF, Moreira NA, Magalhães CS. Qualitative evaluation of scanning electron microscopy methods in a study of the resin cement/dentine adhesive interface. *Microsc Microanal* 2014; 20:268-75.
48. Pulido CA, De Oliveira Franco AP, Gomes GM, Bittencourt BF, Kalinowski HJ, Gomes JC, Gomes OM. An in situ evaluation of the polymerization shrinkage, degree of conversion, and bond strength of resin cements used for luting fiber posts. *J Prosthet Dent* 2016; 116:570-6.
49. Rodrigues RV, Sampaio CS, Pacheco RR, Pascon FM, Puppin-Rontani RM, Giannini M. Influence of adhesive cementation systems on the bond strength of relined fiber posts to root dentin. *J Prosthet Dent* 2017; 118:493-9.
50. Rüttermann S, Braun A, Janda A. Shear bond strength and fracture analysis of human vs. bovine teeth. *PLoS One* 2013; 8:e5981.
51. Saskalauskaite E, Tam LE, McComb D. Flexural strength, elastic modulus, and pH profile of self-etch resin luting cements. *J Prosthodont* 2008;17:262-8.
52. Senawongse P, Otsuki M, Tagami J, Mjor I. Age-related changes in hardness and modulus of elasticity of dentine. *Arch Oral Biol* 2006; 51:457-63.

53. Signore A, Benedicenti S, Kaitsas V, Barone M, Angiero F, Ravera G. Long-term survival of endodontically treated, maxillary anterior teeth restored with either tapered or parallel-sided glass-fiber posts and full-ceramic crown coverage. *J Dent* 2009; 37:115-21.
54. Silikas N, Eliades G, Watts DC. Light intensity effects on resin-composite degree of conversion and shrinkage strain. *Dent Mater* 2000; 16:292-6.
55. Simões TC, Luque-Martinez Í, Moraes RR, Sá A, Loguercio AD, Moura SK. Longevity of bonding of self-adhesive resin cement to dentin. *Oper Dent* 2016; 41:E64-72.
56. Šimundić Munitić M, Bago I, Glockner K, Kqiku L, Gabrić D, Anić I. Effect of different laser treatments on the bond strength of intracanal fiber posts cemented with a self-adhesive resin cement. *J Prosthodont* 2018; 29:1-7.
57. Soares FZ, Follak A, Da Rosa LS, Montagner AF, Lenzi TL, Rocha RO. Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Dent Mater* 2016; 32:1385-93.
58. Souza G, Braga RR, Cesar PF, Lopes GC. Correlation between clinical performance and degree of conversion of resin cements: a literature review. *J Appl Oral Sci* 2015; 23:358-68.
59. Spazzin AO, Galafassi D, de Meira-Junior AD, Braz R, Garbin CA. Influence of post and resin cement on stress distribution of maxillary central incisors restored with direct resin composite. *Oper Dent* 2009; 34:223-29.
60. Suh BI, Feng L, Pashley DH, Tay FR. Factors contributing to the incompatibility between simplified-step adhesives and chemically cured or dual-cured composites. Part III. Effect of acidic monomers. *J Adhes Dent* 2003; 5:267-82.

61. Szesz A, Cuadros-Sánchez J, Hass V, Da Cruz GK, Arrais CA, Reis A, Loguercio AD. Influence of delivered radiant exposure values on bonding of fiber posts to root canals. *J Adhes Dent* 2015; 17:181-8.
62. Ubaldini ALM, Benetti AR, Sato F, Pascotto RC, Medina Neto A, Baesso ML, Peutzfeldt A. Challenges in luting fibre posts: Adhesion to the post and to the dentine. *Dent Mater* 2018; 34:1054-62.
63. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011; 27:17-28.
64. Xu H, Zheng Q, Shao Y, Song F, Zhang L, Wang Q, Huang D. The effects of ageing on the biomechanical properties of root dentine and fracture. *J Dent* 2014; 42:305-11.
65. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci* 2011; 53: 273-82.
66. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, Inoue S, Tagawa Y, Suzuki K, De Munck J, Van Meerbeek B. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res* 2004; 83:454-8.
67. Yoshihara K, Yoshida Y, Hayakawa S, Nagaoka N, Torii Y, Osaka A, Suzuki K, Minagi S, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Self-etch monomer-calcium salt deposition on dentin. *J Dent Res* 2011; 90:602-6.
68. Zhou J, Wurihan, Shibata Y, Tanaka R, Zhang Z, Zheng K, Li Q, Ikeda S, Gao P, Miyazaki T. Quantitative/qualitative analysis of adhesive-dentin interface in the presence of 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate. *J Mech Behav Biomed Mater* 2018; 92:71-8.

69. Zicari F, Van Meerbeek B, Scotti R, Naert I. Effect of ferrule and post placement on fracture resistance of endodontically treated teeth after fatigue loading. *J Dent* 2013; 41:207-15.
70. Wang R, Shi Y, Li T, Pan Y, Cui Y, Xia W. Adhesive interfacial characteristics and the related bonding performance of four self-etching adhesives with different functional monomers applied to dentin. *J Dent* 2017; 62:72-80.

Table 1 - Materials used, their compositions and cementation protocols adopted in the cementation of fiber posts.

Resin Cements	Materials	Composition	Cementation Protocol
Dual-curing	RelyX Ultimate, 3M Co.; St. Paul, MN, USA	Base paste: Methacrylate monomer, Radiopaque silanated fillers, Initiator components, Stabilizers, Rheological additives. Catalyst paste: Methacrylate monomers, Radiopaque alkaline (basic) fillers, Initiator components, Stabilizers, Pigments, Rheological additives, Fluorescence dye, Dual-cure activator for Single Bond Universal Adhesive. (Lot: 657787)	The fiber post was actively cleaned with ethanol (70 vol%) for 15 seconds, and air dried. One layer of silane were actively applied for 1 minute on the post surface, followed by a gentle stream of air. One layer of Single Bond Universal Adhesive was actively applied with a microbrush in the fiber post, followed by light jet air for 5 seconds. The root surfaces were covered with black adhesive tape to protect them from external light exposure. Root dentin was cleaned with 2.5% NaOCl for 60 seconds, followed by rinsing with distilled water, using an irrigation syringe, and drying with
	RelyX Ceramic Primer, 3M	Ethyl alcohol, Water, Methacryloxypropyltrimethoxysilane (Lot: N777131)	absorbent paper points. Two layers of Single Bond Universal Adhesive were actively applied with a microbrush as self-polymerizing technique for 20

Continue...

	Co.; St. Paul, MN, USA			seconds, the excess was removed with absorbent paper points, followed by gentle air drying for 5 seconds. The resin cement was mixed and inserted into the canal with a syringe and a needle tip. Subsequently, the fiber post was positioned and light activated for 20 seconds in each position (buccal and lingual) with polywave LED light-polymerizing unit (Radii Plus, SDI Limited; Bayswater, AU), wavelength range of 440-480 nm and 1350 mW/cm ² .
	Single Bond Universal Adhesive, 3M Co.; St. Paul, MN, USA	MDP Dimethacrylate Vitrebond™ Ethanol, Water, Initiators, 659902)	Phosphate resins, Copolymer, Silane. (Lot: 659902)	
Self-adhesive	RelyX U200, 3M Co.; St. Paul, MN, USA	Base paste: Methacrylate containing phosphoric acid Methacrylate monomers, fillers, Initiator components, Stabilizers, Rheological additives. Catalyst paste: Methacrylate monomers, Alkaline (basic) fillers,	monomers groups, Silanated components, additives. Methacrylate fillers,	The fiber post was actively cleaned with ethanol (70 vol%) for 15 seconds, and air dried. One layer of silane were actively applied for 1 minute on the post surface, followed by a gentle stream of air. The root surfaces were covered with black adhesive tape to protect them from external light exposure. Root dentin was cleaned with 2.5% NaOCl for 60 seconds, followed by rinsing

Continue...

Silanated fillers, Initiator components, Stabilizers, Pigments, Rheological additives. (Lot: 640729)

RelyX Ethyl alcohol, Water, Ceramic Methacryloxypropyltrimethoxysilane Primer, 3M (Lot: N777131) Co.; St. Paul, MN, USA

with distilled water, using an irrigation syringe, and drying with absorbent paper points. The resin cement was mixed and inserted into the canal with a syringe and a needle tip. Subsequently, the fiber post was positioned and light activated for 20 seconds in each position (buccal and lingual) with polywave LED light-polymerizing unit (Radii Plus, SDI Limited; Bayswater, AU), wavelength range of 440-480 nm and 1350 mW/cm².

Table 2 - Mean push-out bond strength (\pm SD) of experimental groups according to the resin cement for each root third.

Resin cement	Root third	Young human	Young bovine	Old human	Adult bovine
		root dentin	root dentin	root dentin	root dentin
RelyX Ultimate	<i>Coronal</i>	18.59 (0.29) ^{Aa}	16.60 (0.27) ^{ADa}	11.08 (3.77) ^{BCa}	15.61 (0.24) ^{BDa}
	<i>Middle</i>	17.53 (0.28) ^{Ab}	15.41 (0.21) ^{Bb}	10.21 (3.76) ^{Ca}	14.55 (0.32) ^{Bb}
	<i>Apical</i>	16.35 (0.33) ^{Ac}	14.53 (0.30) ^{ADc}	9.05 (3.95) ^{BCa}	13.55 (0.24) ^{BDc}
RelyX U200	<i>Coronal</i>	15.61 (0.29) ^{Aa}	13.47 (0.35) ^{Ba}	7.39 (0.27) ^{Ca}	13.51 (0.27) ^{Ba}
	<i>Middle</i>	14.41 (0.30) ^{Ab}	12.61 (0.31) ^{Bb}	6.38 (0.28) ^{Cb}	12.29 (0.31) ^{Bb}
	<i>Apical</i>	13.52 (0.32) ^{Ac}	11.51 (0.32) ^{Bc}	5.32 (0.25) ^{Cc}	11.37 (0.25) ^{Bc}

*The different capital letters indicate significant differences in the comparison in the same rows. The different lowercase letters indicate significant differences in the comparison in the same columns.

Table 3 - Distribution of failure modes found for resin cements RelyX Ultimate and RelyX U200 in each experimental group.

Resin Cement	Group	Failure Mode			
		Adhesive	Mixed	Cohesive in material	Cohesive in dentin
RelyX Ultimate	Young human root dentin	9 (16.6%)	18 (33.3%)	6 (11.1%)	21 (38.8%)
	Young bovine root dentin	11 (20.3%)	14 (25.9%)	7 (12.9%)	22 (40.7%)
	Old human root dentin	25 (46.2%)	16 (29.6%)	6 (11.1%)	7 (12.9%)
	Adult bovine root dentin	8 (14.8%)	17 (31.4%)	6 (11.1%)	23 (42.5%)
RelyX U200	Young human root dentin	12 (22.2%)	27 (50.0%)	5 (9.2%)	10 (18.5%)
	Young bovine root dentin	13 (24.1%)	22 (40.7%)	9 (16.6%)	10 (18.5%)
	Old human root dentin	18 (33.3%)	25 (46.2%)	7 (12.9%)	4 (7.4%)
	Adult bovine root dentin	8 (14.8%)	24 (44.4%)	9 (16.6%)	13 (24.1%)

Fig. 1 - RelyX Ultimate resin cement line in coronal third (magnification $\times 1000$). A. Young bovine root dentin, B. Adult bovine root dentin, C. Young human root dentin, D. Old human root dentin.

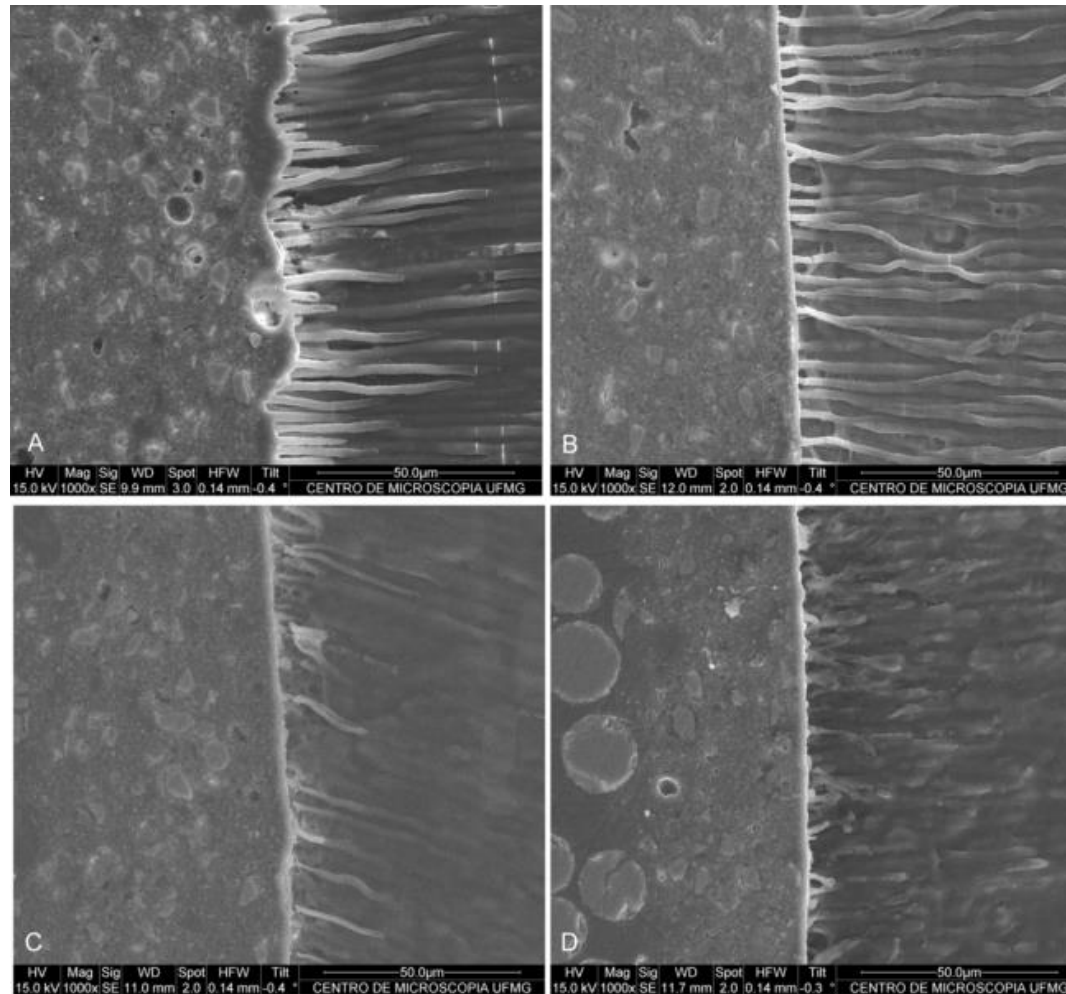


Fig. 2 - RelyX U200 resin cement line in coronal third (magnification $\times 1000$). A. Young bovine root dentin, B. Adult bovine root dentin, C. Young human root dentin, D. Old human root dentin.

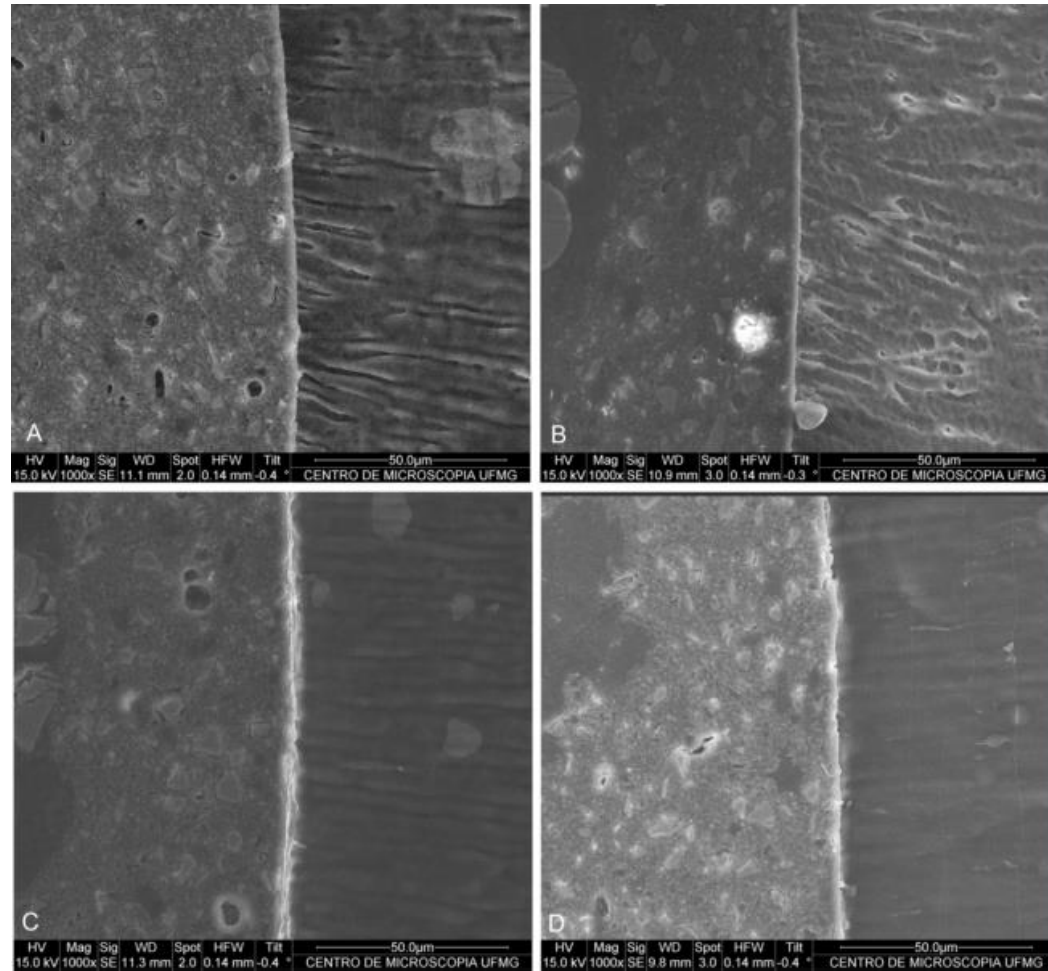


Table 4 - Mean degree of conversion (\pm SD) of RelyX Ultimate and RelyX U200 according to the root third.

Root third	RelyX Ultimate	RelyX U200
Coronal	75.83 (1.15) ^{Aa}	62.67 (0.99) ^{Ba}
Middle	73.77 (0.67) ^{Ab}	55.43 (1.98) ^{Bb}
Apical	72.40 (0.81) ^{Ac}	52.28 (1.19) ^{Bc}

*The different capital letters indicate significant differences in the comparison in the same rows. The different lowercase letters indicate significant differences in the comparison in the same columns.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se que a idade tem efeito nos aspectos morfológicos, químicos e físicos da dentina radicular humana. O envelhecimento ocasiona a diminuição do número, diâmetro e área dos túbulos dentinários, aumenta o grau de mineralização, compromete a organização e qualidade da matriz orgânica e modifica o comportamento mecânico da dentina radicular humana. Quando da fixação de pinos de fibra de vidro, a idade comprometeu a adesão ao substrato radicular humano, com valores de resistência de união inferiores na dentina radicular humana madura. A dentina radicular bovina não se mostrou afetada pela idade, o que pode ser consequência do curto intervalo de tempo entre as faixas etárias analisadas. Assim, quando da necessidade de utilização da dentina radicular bovina em substituição à humana, é necessário considerar os efeitos da origem e idade nos desfechos analisados. Como implicação clínica dos resultados, durante procedimentos clínicos na dentina radicular de pacientes idosos é prudente considerar o efeito das alterações fisiológicas decorrentes do envelhecimento do substrato radicular.

Como limitações deste estudo, destaco o curto intervalo de tempo entre as faixas etárias de dentina radicular bovina e a ausência de envelhecimento artificial de espécimes no teste de resistência ao cisalhamento por extrusão. A coleta e seleção de dentes humanos, dentro das faixas etárias estabelecidas e com qualidade adequada, foi considerada a principal dificuldade encontrada na execução deste estudo.

REFERÊNCIAS

ARIAS, M. P. *et al.* Effect of ultrasonic streaming on intra-dentinal disinfection and penetration of calcium hydroxide paste in endodontic treatment. **J. Appl. Oral. Sci.**, v.24, n. 6, p. 575-581, Nov. 2016.

AROLA, D.; REPROGEL, R. K. Effects of aging on the mechanical behavior of human dentin. **Biomaterials**, v.26, n. 18, p. 4051-4061. 2005.

BAJAJ, D. *et al.* Age, dehydration and fatigue crack growth in dentin. **Biomaterials**, v.27, n. 11, p. 2507-2517, Dez. 2006.

BOHRER, T. C. *et al.* Endodontic sealers affect the bond strength of fiber posts and the degree of conversion of two resin cements. **J. Adhes. Dent.**, v.19, p. 1-8, Abr. 2018.

BRACKETT, W. W. *et al.* The effect of subject age on the microtensile bond strengths of a resin and a resin-modified glass ionomer adhesive to tooth structure. **Oper. Dent.**, v.33, n. 3, p. 282-286, Mai-Jun. 2008.

BROWNER, W. S.; NEWMAN, T. B.; HULLEY, S. B. Estimando o tamanho de amostra e o poder estatístico: Aplicações e exemplos. In: HULLEY, S. B.; CUMMINGS, S.R; BROWNER, W. S.; GRADY, D. G.; NEWMAN, T. B. **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 384p.

CAMARGO, C. H. *et al.* Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. **J. Endod.**, v.33, n. 4, p. 422-426, Abr. 2007.

CAMARGO, C. H. *et al.* Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. **Dent. Traumatol.**, v.22, n. 6, p. 302-306, Dez. 2006.

CHEUNG, W. A review of the management of endodontically treated teeth - Post, core, and the final restoration. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.136, n. 5, p. 611-619, Mai. 2005.

COSTA, B. M. *et al.* comparative analysis of root dentin morphology and structure of human versus bovine primary teeth. **Microsc. Microanal.**, v.21, n. 3, p. 689-94, Jun. 2015.

CULLEN, J. K. *et al.* The effect of 8.25% sodium hypochlorite on dental pulp dissolution and dentin flexural strength and modulus. **J. Endod.**, v.41, n. 6, p. 920-924, Jun. 2015.

DALEPRANE, B. *et al.* Bond strength of fiber posts to the root canal: Effects of anatomic root levels and resin cements. **J. Prosthet. Dent.**, v.116, n. 3, p. 416-24, Set. 2016.

DALEPRANE, B. *et al.* The effect of light-curing access and different resin cements on apical bond strength of fiber posts. **Oper. Dent.**, v.39, n. 2, p. E93-100, Mar-Apr. 2014.

DE CARVALHO, M. F. F. *et al.* Viability of bovine teeth as a substrate in bond strength tests: A systematic review and meta-analysis. **J. Adhes. Dent.**, v.20, n. 6, p. 471-479. 2018.

FALLA-SOTELO, F. O. *et al.* Analysis and discussion of trace elements in teeth of different animal species. **Braz. J. Phys.**, v.35, n. 3b, p. 761-762, Set. 2005.

FERRARI, M. *et al.* Long-term retrospective study of the clinical performance of fiber posts. **Am. J. Dent.**, v.20, n. 5, p. 287-91, Out. 2007.

GALHANO, G. *et al.* Comparison of resin push-out strength to root dentin of bovine- and human-teeth. **Indian. J. Dent. Res.**, v.20, n. 3, p. 332-336, Jul-Set. 2009.

GOLDBERG, M. *et al.* Dentin: structure, composition and mineralization - The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. **Front. Biosci.**, v.1, n. 3, p. 711-735, Jan. 2011.

GOMES, B. P. *et al.* Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. **Int. Endod. J.**, v.36, n. 4, p. 267-275, Abr. 2003.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M. *et al.* Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. **Dent. Traumatol.**, v.28, n. 4, p. 320-323, Aug. 2012.

HARA, A. T. *et al.* Compare bovine and human teeth in caries progression, inhibition and biofilm composition. **Caries Res.**, v.37, p. 339-344, 2003.

HETRODT, F. *et al.* Natural saliva as an adjuvant in a secondary caries model based on *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral. Biol.**, v.90, p. 138-143, Jun. 2018.

JASTRZEBSKA, M. *et al.* Raman spectroscopic study of glutaraldehyde-stabilized collagen and pericardium tissue. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, v.14, n. 2, p. 185-97, 2003.

KARAN, K. *et al.* Chemical profile of the dentin substrate in non-cariou cervical lesions. **Dent. Mater.**, v.25, n. 10, p. 1205-1212, Out. 2009.

KATO, M. T. *et al.* Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. **Caries Res.**, v.45, n. 5, p. 429-34, Jan. 2011.

KATZ, J. L. *et al.* Multiscale mechanics of hierarchical structure/property relationships in calcified tissues and tissue/material interfaces. **Mater. Sci. Eng. A. Struct. Mater.**, v.27, n. 3, p. 450-468, Abr. 2007.

KINNEY, J. H. *et al.* Age-related transparent root dentin: mineral concentration, crystallite size, and mechanical properties. **Biomaterials**, v.26, n. 16, p. 3363-3376. Jun. 2005.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**., v.33, n. 1, p. 159-174, Mar. 1977.

LIPPERT, F.; CHURCHLEY, D.; LYNCH, R. J. Effect of lesion baseline severity and mineral distribution on remineralization and progression of human and bovine dentin caries lesions. **Caries Res.**, v.49, n. 5, p. 467-476, Jul. 2015.

MARSHALL, G. W.Jr. *et al.* The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J. Dent.**, v.25 n. 6, p. 441-458, Nov. 1997.

MARTINS, V. L. *et al.* Effect of surface protection on the permeability of eroded dentin. **J. Conserv. Dent.**, v.21, n. 1, p. 16-20, Jan-Feb. 2018.

MELLBERG, J. R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. **J. Dent. Res.**, v. 71, Spec No, p. 913-919, 1992.

MOREIRA, D. M. *et al.* Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. **J. Endod.**, v.35, n. 7, p. 1023-1027, Jul. 2009.

NAKAMOTO, A. *et al.* Effect of fluoride mouthrinse and fluoride concentration on bonding of a one-step self-etch adhesive to bovine root dentin. **J. Oral. Sci.**, v.61, n. 1, p. 125-132. 2019.

NANCI, A. Complexo dentina-polpa. In: NANCI, A. **Ten Cate histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NAUMANN, M. *et al.* 10-Year survival evaluation for glass-fiber-supported postendodontic restoration: a prospective observational clinical study. **J. Endod.**, v.38, n. 4, p. 432-435, Fev. 2012.

OLIVEIRA, G. C. *et al.* Influence of tooth age and etching time on the microtensile bond strengths of adhesive systems to dentin. **J. Adhes. Dent.**, v.14, n. 3, p. 229-234, Jun. 2012.

OLIVER, W. C.; PHARR, G. M. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. **J. Mater. Res.**, v.7, n. 6, p. 1564-1583, Jun, 1992.

ORTIZ-RUIZ, A. J. *et al.* Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. **Ann. Anat.**, v.218, p. 7-17, Jul. 2018.

OZER, F. *et al.* Effect of tooth age on microtensile bond strength of two fluoride-releasing bonding agents. **J. Adhes. Dent.**, v.7, n. 4, p. 289-95, 2005.

PALO, R. M, *et al.* Quantification of peroxide ion passage in dentin, enamel, and cementum after internal bleaching with hydrogen peroxide. **Oper. Dent.**, v.37, n. 6, p. 660-664, Nov-Dez. 2012.

PERDIGÃO, J. Dentin bonding - Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. **Dent. Mater.**, v.26, n. 2, p. e24-e37, Fev. 2010.

PERDIGÃO, J.; SEZINANDO, A.; MONTEIRO, P. C. Effect of substrate age and adhesive composition on dentin bonding. **Oper. Dent.**, v.38, n. 3, p. 267-274, Mai-Jun. 2013.

PEREIRA, J. R. *et al.* The influence of different cements on the pull-out bond strength of fiber post. **J. Prosthet. Dent.**, v.112, n. 1, p.59-63, Jul. 2014.

PEREIRA, R.D. *et al.* Effect of photoactivation timing on the mechanical properties of resin cements and bond strength of fiberglass post to root dentin. **Oper. Dent.**, v.40, n. 5, p. E206-21, Set-Out. 2015.

PIANELLI, C. *et al.* The micro-Raman spectroscopy, a useful tool to determine the degree of conversion of light-activated composite resins. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.48, n. 5, p. 675-81, 1999.

PINTO, C. L. *et al.* The influence of post system design and material on the biomechanical behavior of teeth with little remaining coronal structure. **J. Prosthodont.**, v.14, Mai. 2018.

PUCÉAT, E.; REYNARD, B.; LÉCUYER, C. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites? **Chem. Geol.**, v.205, n. 1-2, p. 83-97, Abr. 2004.

PULIDO, C. A. *et al.* An in situ evaluation of the polymerization shrinkage, degree of conversion, and bond strength of resin cements used for luting fiber posts. **J. Prosthet. Dent.**, v.116, n. 4, p. 570-576, Out. 2016.

RODRIGUES, R.V. *et al.* Influence of adhesive cementation systems on the bond strength of relined fiber posts to root dentin. **J. Prosthet. Dent.**, v.118, n. 4, p. 493-499, Out. 2017.

SALEHI, H. *et al.* Functional mapping of human sound and carious enamel and dentin with Raman spectroscopy. **J. Biophotonics.**, v.6, n. 10, p. 765-74, Out. 2013.

SCHILKE, R. *et al.* Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. **Arch. Oral. Biol.**, v.45, n. 5, p. 355-61, Mai. 2000.

SCHWARTZ, A. G. *et al.* Mineral distributions at the developing tendon enthesis. **PLoS One**, v.7, n. 11, p. e48630, 2012.

SENAWONGSE, P. *et al.* Age-related changes in hardness and modulus of elasticity of dentine. **Arch. Oral. Biol.**, v.51, n. 6, p. 457-63, Jun. 2006.

SIGNORE, A. *et al.* Long-term survival of endodontically treated, maxillary anterior teeth restored with either tapered or parallel-sided glass-fiber posts and full-ceramic crown coverage. **J. Dent.**, v.37, n. 2, p. 115-121, Fev. 2009.

SOARES, F. Z. *et al.* Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. **Dent. Mater.**, v.32, n. 11, p. 1385-1393, Nov. 2016.

SOUZA, R. O. *et al.* Influence of brush type as a carrier of adhesive solutions and paper points as an adhesive-excess remover on the resin bond to root dentin. **J. Adhes. Dent.**, v.9, n. 6, p. 521-526, Dez. 2007.

TERUEL JDE, D. *et al.* Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. **Arch. Oral. Biol.**, v.60, n. 5, p. 768-75, Mai. 2015.

TJÄDERHANE, L. Dentin basic structure and composition - an overview. **Endodontic Topics**, v.20, p. 3-29, Abr. 2012.

TOLEDANO, M. *et al.* Functional and molecular structural analysis of dentine interfaces promoted by a Zn-doped self-etching adhesive and an in vitro load cycling model. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.**, v.50, p. 131-149, Out. 2015.

ULUSOY, Ö. I. *et al.* The effectiveness of various irrigation protocols on organic tissue removal from simulated internal resorption defects. **Int. Endod. J.**, v.5, Mar. 2018.

WEGEHAUPT, F.J.; WIDMER, R.; ATTIN, T. Is bovine dentine an appropriate substitute in abrasion studies? **Clin. Oral. Investig.**, v.14, n. 2, p. 201-205, Abr. 2010.

XU, C.; WANG, Y. Cross-linked demineralized dentin maintains its mechanical stability when challenged by bacterial collagenase. **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, v.96, n. 2, p. 242-248, Fev. 2011.

XU, H. *et al.* The effects of ageing on the biomechanical properties of root dentine and fracture. **J. Dent.**, v.42, n. 3, p. 305-11, Mar. 2014.

YASSEN, G. H.; PLATT, J. A.; HARA, A. T. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. **J. Oral. Sci.**, v.53, n. 3, p. 273-82, Set. 2011.

ZAYTSEV, D. Correction of some mechanical characteristics of human dentin under compression considering the shape effect. **Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.**, v.49, p. 101-105, Abr. 2015.

ZHANG, Y. R. *et al.* Review of research on the mechanical properties of the human tooth. **Int. J. Oral. Sci.**, v.6, n. 2, p. 61-9, Jun. 2014.

ZISKIND, D. *et al.* Young's modulus of peritubular and intertubular human dentin by nano-indentation tests. **J. Struct. Biol.**, v.174, n. 1, p. 23-30, Abr. 2011.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 60935616.0.0000.5149

Interessado(a): Profa. Cláudia Silami de Magalhães
Departamento de Odontologia Restauradora
Faculdade de Odontologia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de outubro de 2016, o projeto de pesquisa intitulado "Comparação das propriedades das dentinas humanas e bovinas".

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 372/2016

Título do projeto: INFLUÊNCIA DA IDADE NOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS, QUÍMICOS E FÍSICOS DAS DENTINAS RADICULARES HUMANA E BOVINA

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Claudia Silami de Magalhaes

Unidade: Faculdade de Odontologia

Departamento: Departamento de Odontologia Restauradora

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 10/04/2017. Validade: 10/04/2017 à 09/04/2022
Belo Horizonte, 10/04/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO C

Cadastro Nº. _____

BANCO DE DENTES HUMANOS
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Av. Antônio Carlos, 6627. Pampulha. Belo Horizonte. MG.
 Fone: 31 34092404



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, brasileiro, natural de _____, data de nascimento _____, sexo _____, portador da cédula de identidade _____, residente e domiciliado à _____ n.º _____, complemento _____, Bairro _____, CEP _____, Cidade _____, UF _____, telefone _____, autorizo a coleta, o depósito, armazenamento e a utilização do(s) dente(s) _____ pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, ciente de que o(s) mesmo(s) será(serão) utilizado(s) para pesquisa e ensino. Fui esclarecido que este(s) dente(s) foi (foram) extraído(s) como parte do tratamento indicado e documentado em meu prontuário. A utilização deste(s) dente(s) em pesquisa deverá ter sido previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sendo preservada minha identidade em sua divulgação. Fui esclarecido de que tenho direito ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização dos dentes e autorizo seu descarte quando os mesmos não atenderem aos critérios de qualidade.

Autorizo a reutilização dos dentes, dispensando um novo consentimento a cada pesquisa.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

 Assinatura

 Testemunha

ANEXO D**DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES BOVINOS**

A Dimeza Alimentos Ltda, localizado na Avenida Doutor Antônio Chagas Diniz, nº 555, Bairro Cidade Industrial, CEP 32210-160, Contagem, Minas Gerais, com CNPJ 09.021.512/0001-09, registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o número do SIF 147, sendo a responsável técnica deste SIF a médica veterinária Ana Clara Aguilar de Almeida, CRMV-MG 15.720, declara a doação de 90 dentes incisivos bovinos abatidos à professora Cláudia Silami de Magalhães, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, com fins a utilização no desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado "Influência da Idade nos Aspectos Morfológicos, Químicos e Físicos das Dentinas Radiculares Humana e Bovina".

Obs.: A doação dos dentes será efetivada somente após a aprovação do referido projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Contagem, 14 de novembro de 2016.

Ana Clara Aguilar de Almeida

Ana Clara Aguilar de Almeida

Ana Clara Aguilar de Almeida
CRMV-MG 15.720
Responsável Técnica
Supervisão Controle de Qualidade