YVETTE ALANIA SALAZAR

Estudo *in vitro* sobre a remineralização de lesões cariosas com o uso de materiais resinosos contendo partículas de fosfato dicálcico dihidratado funcionalizadas com TEGDMA

> São Paulo 2017

YVETTE ALANIA SALAZAR

Estudo *in vitro* sobre a remineralização de lesões cariosas com o uso de materiais resinosos contendo partículas de fosfato dicálcico dihidratado funcionalizadas com TEGDMA

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais e Biologia oral) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga

São Paulo 2017 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação Serviço de Documentação Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Alania Salazar, Yvette.

Estudo in vitro sobre a remineralização de lesões cariosas com o uso de materiais resinosos contendo partículas de fosfato dicálcico dihidratado funcionalizadas com TEGDMA. / Yvette Alania Salazar ; orientador Roberto Ruggiero Braga -- São Paulo, 2017.

112 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais e Biologia Oral). -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Resinas Compostas. 2. Fosfato de Cálcio - odontologia 3. Remineralização dentária. I. Braga, Roberto Ruggiero. II. Título.

Alania Salazar Y. Estudo *in vitro* sobre a remineralização de lesões cariosas com o uso de materiais resinosos contendo partículas de fosfato dicálcico dihidratado funcionalizadas com TEGDMA. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).	
Instituição:	Julgamento:
,	ŭ

Prof(a). Dr(a	۱)
Instituição:	Julgamento:

Prof(a). Dr(a)		
Instituição:	Julgamento:	

À minha familia,

Aos meus pais, Adolfo e Luisa, por me deixarem voar, mesmo longe de casa, e me darem a oportunidade de aproveitar novos rumos na minha vida.

À Gabriela, por compartilhar comigo a mesma experiência de estar longe de "casa" e, mesmo assim, construir uma nova casa onde que estejamos, com tudo o que isso representa.

Nesta vida eu ganhei vocês e agradeço sempre por isso. Desejo que tudo que eu faça seja motivo de orgulho e felicidade para vocês.

Obrigada sempre!

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque apesar dos conflitos religiosos, senti tranquilidade nos momentos difíceis, força e alegria quando precisava. Por caminhar ao meu lado e me fazer sentir sempre protegida. Por colocar pessoas e situações no meu caminho que só ajudaram na minha formação e por me mostrar as oportunidades para um futuro ainda melhor.

Aos meus pais, Adolfo e Luisa, pelo apoio e amor incondicional. Pela preocupação constante em garantir meu bem-estar. Vocês são exemplo de força e persistência. Se não fosse pelo o esforço de vocês eu não estaria aqui.

À Gabriela, pelo apoio, pela cumplicidade e pela companhia, que mesmo à distância, estou muito orgulhosa de você e das suas conquistas.

Ao Aurélio, pelo amor e paciência, conselho e carinho, cumplicidade e companhia, preocupação e torcida, pelas ideias e discussões, por mostrar como te orgulhas de mim e por ser completamente autêntico. Por compartilhar comigo tua visão de mundo, teus medos, teu conhecimento, tua força e teu futuro. Obrigada por conversar comigo aquele dia no avião!

Ao Prof. Roberto Ruggiero Braga, por me acolher no grupo e por à minha disposição todas as ferramentas possíveis para poder resolver os problemas e atingir os objetivos no doutorado. Sou grata também por poder compartilhar esses mesmos equipamentos com outros grupos que vieram do Peru para pesquisar, fazendo toda a diferença e demonstrando que o teu verdadeiro objetivo é fazer ciência! Muito obrigada pela boa convivência, pela sempre pronta resposta, pelas palavras de incentivo, pelas oportunidades oferecidas e pela confiança em mim depositada. Você tem sido exemplo de altíssima competência, de objetividade, de produtividade, de liderança. Serei sempre grata!

À Profa. Ana Carolina Magalhães, por aceitar me co-orientar. Tua expertise e competência são admiráveis. Carregarei como exemplo a dedicação que você tem com seus alunos. Fui testemunha da admiração, gratidão e respeito que eles têm por ti e sou muito grata pela oportunidade de ter trabalhado junto a você.

Ao Arnaldo e à Sônia, por me adotarem como filha e me fazer sentir acolhida em uma família maravilhosa. Obrigada pelas conversas, conselhos e preocupação com meu bem-estar, sobretudo por me fazer sentir em casa quando estou com vocês.

À **família Alania Salazar**, aos tios e primos, espalhados pelos quatro cantos do mundo, mas mesmo assim unidos. Obrigada pela torcida, carinho e apoio.

Aos meus amigos do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral: à Mariana, pela companhia, longas conversas e amizade em meio às ciclagens. Fizestes divertidas as idas para o laboratório no final de semana. Ao Ezequias, pela prontidão em ajudar, pelo companheirismo, sinceridade e preocupação comigo e por compartilhar todo seu conhecimento. À Amanda, pela companhia nos lanches quando tínhamos que ficar até tarde na faculdade, por compartilhar sua rotina comigo e me ajudar na formatação deste trabalho. À Susana, foi ótimo encontrar outra peruana no departamento. Obrigada por compartilhar comigo a sua experiência e sempre me animar para seguir em frente. Você e a Sandra, são exemplos de que mulher pode ser mãe e pesquisadora, admiro vocês! À Juliana Aguiar e Juliana Castro, obrigada pela amizade e conversas sempre alegres e divertidas. Aos colegas Alice, Ranulfo, Pedro, Sabrina, Pavel, Erick, Stephanie, Kelly, Nishida, Carol Romero, Flavinha, Diego, Marininha, Carina, Karen e Bruno. Obrigada pela companhia nas disciplinas, nos almoços na copa, no dia a dia e pelas conversas nos corredores sempre muito divertidas.

À maravilhosa equipe das Braguetes, que pela proximidade, rotina e companheirismo viraram uma segunda família. À Livia, obrigada pela amizade, conversas e risadas infinitas, por teres me apresentado tua família e pela ajuda sempre que precisei. À Mariel, a minha primeira roommate. Obrigada pela amizade, alegria, pelas conversas divertidas e por sempre estar pronta para ajudar. À

Marcela, sem a tua ajuda no início, definitivamente teria sido muito difícil começar no doutorado. Obrigada pela amizade, confiança e parceria. À Tathy, pois você é exemplo de disciplina e docência, de inteligência e amizade, obrigada por tudo! À Marina e a Mirella, meninas muito inteligentes e com muito potencial. Obrigada pela amizade e parceria. À Handy, você está no começo mas já me ajudou muito mais do que poderias imaginar. Obrigada pela parceria nos últimos testes! Estamos todas para nos ajudar e só pode dar um bom trabalho em equipe. Obrigada a todas vocês!

Aos técnicos, Antônio, Douglas e Larissa, pela competência, criatividade, experiência e prontidão para ajudar, de fato cada um de vocês tem me salvado em inúmeras situações. À Rosinha e à Eli, pelo apoio, conselho, disposição e agilidade para resolver nossas dúvidas. À dona Fran, pela preocupação e pelo café de todos os dias.

Aos professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral: Fernando Neves, Josete Meira, Paulo Capel, Walter Miranda, Paulo Cesar, Aline Simões, Rafael Ballester, Igor Studart, Leonardo Rodrigues Filho, Carlos Eduardo Francci e Victor Arana-Chavez. Obrigada pela convivência, respeito e amizade e principalmente por compartilhar todos seus conhecimentos desinteressadamente, aprendi muito com cada um de vocês.

À Lívia Comar, pela amizade e ajuda nos experimentos realizados em Bauru. À Ana Carol Trentino, por me acolher na tua casa nas viagens para Bauru e pelas conversas e jantas felizes com o Felipe.

Ao Prof. Flávio Vichi, pela contribuição nas nossas pesquisas, através do treinamento e disponibilização de equipamentos no Instituto de Química e ao técnico **Welber**, pelo apoio e disposição.

Ao IPEN, a través da Profa. Dolores Lazar e o Prof. Walter Ussui pela ajuda com os testes realizados nos seus laboratórios.

À FGM, pela doação das partículas de vidro de bário utilizadas na pesquisa.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado

RESUMO

Alania Salazar Y. Estudo in vitro sobre a remineralização de lesões cariosas com o uso de materiais resinosos contendo partículas de fosfato dicálcico dihidratado funcionalizadas com TEGDMA [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de compósitos experimentais contendo nanopartículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) na remineralização de lesões artificiais em esmalte, em função do conteúdo de partículas de DCPD e da funcionalização destas com dimetacrilato de trietileno glicol (TEGDMA). Cinco compósitos contendo uma concentração equimolar de dimetacrilato de glicidila bisfenol A (BisGMA) e TEGDMA e 60 vol% de partículas foram manipulados. A fase inorgânica foi constituída por partículas de vidro de bário silanizadas e 0% (controle: Sem DCPD), 10% ou 20% (em volume) de partículas de DCPD, funcionalizadas (F) ou não (NF) com TEGDMA. Foram produzidas lesões artificiais subsuperficiais em fragmentos de esmalte humano mediante a imersão destes em 30 ml de solução desmineralizante (pH 5.0) por 12 dias a 37°C. Os blocos de esmalte foram divididos em 6 grupos (n=6 - 10), de acordo ao compósito aplicado na lesão: Sem DCPD, 20% DCPD NF, 20% DCPD F, 10% DCPD NF, 10% DCPD F além de um grupo sem a aplicação do compósito (Sem tratamento, ST) e expostos a ciclagem de pH (16 dias, 4 h em solução desmineralizante/pH=5 e 20 h em solução remineralizante/pH=7). As soluções foram trocadas a cada 4 dias, e coletadas para calcular o conteúdo de cálcio e fosfato mediante espectrofotometria. Os corpos de prova foram seccionados longitudinalmente e avaliados mediante microradiografia transversal (TMR). Os parâmetros analisados foram a profundidade da lesão (LD, µm), a perda mineral integrada (ΔZ , vol%.µm) e a média da perda mineral (R). Foi calculado o $\Delta \Delta Z$ (%, $[100x(\Delta Z_{initial} - \Delta Z_{treatment})/\Delta Z_{initial}])$ para estimar a porcentagem de remineralização. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a um critério e o teste de Tukey para comparações múltiplas (alfa = 0.05). Todos os grupos restaurados mostraram recuperação mineral entre 3 a 23%. Houve diferencia significativa entre o $\Delta\Delta Z$ do grupo ST e os contendo DCPD funcionalizado. No entanto, devido à alta dispersão de dados (particularmente no grupo Sem DCPD), não foi observada diferença significativa entre os grupos cuja lesão foi recoberta por compósito. Todos os grupos contendo DCPD mostraram maior recuperação mineral nos terços médio e profundo da lesão. O grupo ST mostrou desmineralização adicional. A concentração de íons cálcio e fosfato no meio de imersão não foi influenciada pela presença de DCPD, independentemente da funcionalização ou da porcentagem de DCDP no compósito. Concluiu-se que os compósitos contendo DCPD foram capazes de promover a recuperação mineral nas áreas mais profundas da lesão.

Palavras-chave: Resinas Compostas. Fosfato de cálcio. Remineralização dentária.

ABSTRACT

Alania Salazar Y. Remineralization potential of resin composites containing TEGDMA-functionalized calcium phosphate particles [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

The aim of the study was to evaluate the effect of experimental composites containing dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) nanoparticles on remineralization of artificial enamel lesions, as a function of DCPD particle content and their functionalization with triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA). Five composites containing equal parts (in mols) of bisphenol A glycidyl methacrylate (BisGMA) and TEGDMA and 60 vol% of filler content were manipulated. Filler phase was constituted by silanized barium glass (BG) and 0% (control: no DCPD), 10% or 20% (by volume) of DPCD particles, either functionalized (F) or non-functionalized (NF) with TEDGMA. Artificial subsurface lesions were produced in human enamel fragments by immersing them in 30 ml of demineralization solution (pH 5.0) for 12 days at 37°C. Fragments were divided into six groups (n= 6 - 10), according to the composite applied on the lesion: no DCPD, 20% DCPD NF, 20% DCPD F, 10% DCPD NF, 10% DCPD F plus an unrestored group (non treated, NT) and exposed to pH cycling (16 days, 4 h in demineralization solution/pH=5 and 20 h in remineralization solution/pH=7). Every 4 days the solutions used were changed and collected to calculate calcium and phosphate content through spectrophotometry. Specimens were sectioned longitudinally and evaluated using transverse microradiography (TMR) for lesion depth (LD, in μ m) and integrated mineral loss (ΔZ , vol%.µm). $\Delta\Delta Z\%$ [100x($\Delta Z_{initial} - \Delta Z_{treatment}$)/ $\Delta Z_{initial}$] was used to estimate remineralization. Data were analyzed by one-way ANOVA/Tukey test (alpha: 0.05 for all tests). All restored groups showed enamel remineralization, ranging from 3% to 23%. Significant differences were observed between NT group and groups containing functionalized DCPD. However, due to high data scattering (particularly in the group without DCPD), no statistically significant differences were found between the groups that had their lesions covered by composite. Groups containing DCPD showed more mineral recovery in the middle and the deepest third of the lesion. NT

group showed further demineralization. Calcium and phosphate ion concentrations were not influenced by the DCPD particle content or its functionalization with TEGDMA. In conclusion, all composites containing DCPD particles were able to promote mineral recovery of the enamel lesion, mainly on the deeper areas of the lesion.

Keywords: Composite resins. Calcium phosphate. Tooth remineralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 4.7 Espécime restaurado com o compósito recobrindo apenas a metade do bloco (A: vista superior, B: vista lateral)49

- Gráfico 5.1 Box-plot mostrando a distribuição dos dados de ΔΔΖ (%) em função dos grupos. O símbolo indica o valor da média e a linha horizontal dentro da caixa, a mediana60
- Figura 5.2 Distribuição dos valores de recuperação mineral (em porcentagem) dos grupos em função da profundidade da lesão. Valores negativos indicam desmineralização adicional61
- Figura 5.3 Imagens de microradiografias do esmalte representando a lesão inicial e a situação após ciclagem DES/RE de cada um dos grupos63

- Figura 5.11 Concentrações de íons HPO4²⁻ (ppm) detectadas na solução RE em função dos períodos de ciclagem analisados para todos grupos experimentais com compósitos contendo DCPD e para o grupo sem aplicação de compósito. Letras maiúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para os diferentes grupos em um mesmo período. Letras minúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para o mesmo material nos diferentes períodos (Kruskal-

LISTA DE TABELAS

 Tabela 4.1 - Delineamento experimental
 48

- Tabela 5.4 Médias e desvios-padrão da recuperação mineral em função da profundidade da lesão. Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para cada coluna. Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre as profundidades para um determinado tratamento (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05)62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
BET	Método Brunauer – Emmett - Teller
Bis-GMA	Dimetacrilato de glicidila bisfenol A
CaP	Fosfato de cálcio
CPP	Fosfopeptido de caseina
DCPD	Fosfato di-cálcico dihidratado
DES	Desmineralização
DRX	Difractometria de raio X
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDX	Espectroscopia de raio X por dispersão de energia
F	Funcionalizado
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HEMA	Metacrilato de Hidroxietila
ICDD	International Center for Diffraction Data
LD	Lesion depth
MMPs	Metaloproteinases
NF	Não funcionalizado
рН	Potencial de hidrogênio
ppm	Partes por milhão
QLF	Quantitative light-induced fluorescence
R	Ratio
RE	Remineralização
RPM	Rotações por minuto
SBF	Simulated Body Fluid
SEM	Microscópio eletrônico de varredura
SISNEP	Sistema Nacional de Ética em Pesquisa
SL	Superficial layer
TEGDMA	Dimetacrilato de trietilenoglicol
TCP	Fosfato tricálcico
TEM	Microscópio eletrônico de transmissão
TMR	Microradiografia transversal

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Ca ⁺²	Íons cálcio
CO3 ⁻²	Íons carbonato
D ₅₀	Diâmetro no percentil 50
g/L	Gramas por litro
HPO4 ⁻²	Íons hidrogênio fosfato
m²/g	Metro quadrado dividido por gramas
mm ³	Milimetro cúbico
mW/cm ²	MiliWatts por centimetro quadrado
nm	Nanômetros
PO ₄ -3	Íons fosfato
ΔZ	Perda mineral da lesão
ΔΔΖ	Variação do ΔZ em porcentagem
μm	Micrômetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	PROCESO DES/RE	29
2.2	REMINERALIZAÇÃO	34
2.3	REMINERALIZAÇÃO COM MATERIAIS RESINOSOS	37
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO	
	DE CÁLCIO	41
4.2	PREPARAÇÃO DOS COMPÓSITOS EXPERIMENTAIS	45
4.3	PREPARO DOS DENTES E PRODUÇÃO DE LESÕES ARTIFICIAIS DE	
	CÁRIE	45
4.4	PROCEDIMENTO RESTAURADOR E CICLAGEM DE PH	49
4.5	AVALIAÇÃO MICRORADIOGRÁFICA (TRANSVERSE	
	MICRORADIOGRAPHY, TMR)	50
4.6	LIBERAÇÃO DE ÍONS	54
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	57
5.1	MICRORADIOGRAFIA TRANSVERSAL (TMR)	57
5.2	LIBERAÇÃO DE ÍONS	64
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICES	97
	ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

A longevidade de restaurações em compósito é em muitos casos limitada pelo surgimento de novas lesões de cárie próximo à interface dente/restauração (1, 2). Uma das estratégias que poderiam contribuir para a redução do risco de novas lesões é a incorporação de ortofosfatos de cálcio (CaP) nos compósitos restauradores. Nanopartículas de CaP são capazes de liberar íons cálcio e fosfato em níveis suficientes para promover a deposição de apatita nos tecidos dentários mineralizados (3, 4). De fato, diversos estudos verificaram que lesões artificiais não-cavitadas em esmalte recuperaram entre 14% e 38% do seu conteúdo mineral após 28-30 dias de ciclagem de pH quando em contato com compósitos resinosos contendo 40% em peso de fosfato de cálcio amorfo (ACP) (5-7).

Infelizmente, a adição de CaP em compósitos resinosos provoca uma redução significativa na sua resistência mecânica devido à falta de ligação química entre as partículas CaP e a fase resinosa (5, 8). Uma das estratégias propostas para minimizar este efeito é a funcionalização das partículas de CaP (3, 9). No entanto, estudos que avaliaram o efeito da silanização de partículas de CaP verificaram que o caráter hidrofóbico do silano interfere no trânsito de fluidos e íons, retardando o acesso da água às partículas e diminuindo a liberação de íons (10, 11).

Recentemente, nanopartículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) funcionalizadas com dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) foram sintetizadas com o objetivo de melhorar a interação destas partículas com a fase orgânica resinosa e assim aumentar a resistência mecânica do compósito, sem prejudicar a liberação de íons (11). Dentre as diferentes fases de CaP, o DCPD foi escolhido por apresentar índice de refração (1,54 - 1,55) similar ao vidro de bário (1,53), o que permite que a transmissão da luz durante a fotopolimerização do compósito não seja afetada. O uso do TEGDMA como agente funcionalizante permitiria a sua copolimerização com os monômeros contidos na matriz resinosa. Com efeito, quando estas partículas foram adicionadas em materiais com matriz de BisGMA:TEGDMA obteve-se valores até 40% maiores na resistência à flexão biaxial após 24 horas (12, 13).

O DCPD, em relação a outras fases do ortofosfato de cálcio, apresenta

solubilidade relativamente alta devido a razão de Ca/P=1 e pela presença de moléculas de água em sua estrutura (~0,088 g/L a 25°C, versus ~0,0003 g/L da hidroxiapatita, com Ca/P=1,67) (14, 15), o que poderia representar uma vantagem em relação à liberação de íons. Estudos prévios mostraram que a funcionalização com TEGDMA não afetou as concentrações iônicas de Ca²⁺ liberadas por resinas experimentais sem cargas de reforço e compósitos (12, 13).

O efeito remineralizador de compósitos contendo nanopartículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA ainda não foi avaliado. Assim, o presente estudo se propôs a verificar o efeito do conteúdo de nanopartículas e da funcionalização sobre o conteúdo mineral de lesões artificiais de cárie em esmalte.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROCESSO DES/RE

Eventos de queda do pH neutralizados por ação da saliva ocorrem constantemente na cavidade oral, provocando processos de desmineralização e remineralização dentária. A desmineralização se refere à dissolução dos cristais de apatita do esmalte mediante a liberação de íons para a saliva/biofilme, enquanto a remineralização descreve a precipitação mineral na superfície do esmalte (16) e o crescimento dos cristais de apatita parcialmente dissolvidos (17, 18). O esmalte é relativamente estável no ambiente bucal e, em geral, há um equilíbrio dinâmico entre os processos de desmineralização (DES) e remineralização (RE). A lesão cariosa ocorre quando há um desequilíbrio entre a DES e a RE como resultado do frequente metabolismo de carboidratos pelas bactérias do biofilme, o que resulta na produção de ácidos (16, 19, 20)

O esmalte tem uma estrutura morfológica e propriedades mecânicas únicas, se diferenciando dos outros tecidos mineralizados como o osso e a dentina. Este tecido é composto por cristais de hidroxiapatita carbonatada deficiente em cálcio $[Ca_{10-x}Na_{x}(PO_{4})_{6-y}(CO_{3})_{z}(OH)_{2-u}F_{u}]$ (21) com formato hexagonal, altamente organizados (96% em peso e 87% em volume) e, entre estes cristais, há uma matriz orgânica composta por proteínas complexas como ameloblastinas e enamelinas (17). Os cristais se organizam paralelamente ao longo eixo do dente, formando os prismas do esmalte, agrupando-se em média 1000 cristais por prisma (18, 22, 23). Entre os prismas, há uma região interprismática onde os cristais apresentam um desvio de 60-70% do longo eixo. Esta configuração permite a presença de vias de difusão, as quais representam uma característica importante relacionada ao desenvolvimento das lesões cariosas, pois através destas vias, preenchidas por material orgânico e água, ocorrem trocas iônicas. A densidade dos prismas varia em função da profundidade do esmalte, assim, quanto mais próximo à dentina, o tecido apresenta-se mais poroso, com mais fluídos e proteínas (18).

A hidroxiapatita pode apresentar defeitos e substituições de elementos na sua composição, sendo comum encontrar carbonatos, fluoretos, sódio e magnésio dentro da estrutura cristalina. O centro dos cristais de hidroxiapatita tem maior conteúdo de carbonato. A inclusão de carbonato e magnésio torna a apatita mais instável e solúvel em meio bucal (pH crítico 6,2), enquanto a inclusão de flúor torna o cristal mais ácido resistente (pH crítico 4,5). A apatita pura apresenta solubilidade intermediária (pH crítico 5,5) (18, 21, 24). O pH crítico corresponde ao valor de pH no qual a solução encontra-se saturada em relação ao esmalte. Esta saturação depende da solubilidade dos cristais do esmalte e, em menor extensão da atividade dos constituintes minerais da saliva (cálcio, fosfato e o fluoreto)(21). Dessa forma, entende-se por que a superfície do esmalte, rica em flúor e pobre em carbonato, se carateriza por ter maior dureza e ser menos porosa que a subsuperfície. A forma, composição e organização dos cristais determinam as propriedades do esmalte em relação a sua dureza, resistência à fratura e solubilidade (18, 22, 23, 25) e definem o padrão de desmineralização do esmalte diante de um ataque ácido (21).

A saliva tem um papel importante pela capacidade de neutralizar os ácidos e de fornecer íons de cálcio e fosfato para o biofilme, necessários para induzir a remineralização (17, 19, 26). A concentração de cálcio salivar varia entre 40 - 120 ppm. A saliva tem menor concentração de cálcio e maior concentração de fosfato inorgânico que o plasma e é saturada com relação a certos sais de fosfato de cálcio (19). Quanto menor o pH, maior a presença de cálcio iônico, sendo este o responsável pelo equilibrio do processo DES/RE (21). A camada superficial do esmalte encontra-se em contato constante com a saliva, o que auxilia na manutenção da integridade estrutural do esmalte (19).

O material orgânico (peptídeos salivares e glicoproteínas) presente na superfície do esmalte, conhecido como película adquirida, tem influencia sobre os processos DES/RE. A permeabilidade iônica seletiva da película adquirida restringe o transporte de íons para dentro e para fora dos tecidos dentários, inibe a desmineralização do esmalte e determina a composição da microbiota inicial que adere ao dente (21). A formação do biofilme acontece após a adesão das células bacterianas à película adquirida. O biofilme funciona como reservatório de eletrólitos remineralizantes como cálcio, fosfato e flúor (18, 21, 22, 27, 28), apresentando inclusive maiores concentrações de cálcio e fosfato que a saliva (21).

O processo de dissolução do esmalte é complexo e inclui três fatores principais (saliva, esmalte e biofilme), os quais envolvem outros sub-fatores dependentes. Os fatores associados são os referentes à saliva e ao fluído do biofilme dentário (pH, composição, saturação e hidrodinâmica), ao esmalte (composição e solubilidade) e à superfície exposta (presença de defeitos, íons absorvidos e transformação de fases). Em linhas gerais, guando o valor de pH é menor que 5,5, a hidroxiapatita iniciará sua dissolução. Porém, se o pH for 4,5 haverá deposição para a fluorapatita concomitante à dissolução da hidroxiapatita. Como a fluorapatita se deposita principalmente na superfície do esmalte e a hidroxiapatita predomina subsuperfície, sucessivos desafios na após promoverão desmineralizantes, as alterações no conteúdo mineral 0 desenvolvimento de uma lesão subsuperficial, observada apenas microscopicamente (21, 29). Assim, o H⁺ dos ácidos produzidos pelas bactérias reage com os íons CO_3^{-2} , PO_4^{-3} e OH⁻ presentes no fluido do biofilme e no esmalte, provocando a subsaturação destes em relação à hidroxiapatita e esgotando a capacidade de tamponamento do meio. Sendo que, para manter o equilíbrio, ocorre a saída do fosfato, carbonato e hidroxila da apatita, promovendo a sua dissolução (19, 21).

Após a desmineralização, esmalte torna mais opaco 0 se е microscopicamente a superfície do esmalte se mostra bastante rugosa, apresentando inúmeros poros (aproximadamente de 100 nm) localizados principalmente na subsuperfície (16). Os cristais desmineralizados se apresentam mais finos e com núcleos ocos. A região interprismática se encontra dissolvida, resultando em espaços entre os prismas de até 600 nm (16), o que permite maior penetração do ácido e o avanço em profundidade do processo de desmineralização (21). Estes minerais se depositam na superfície externa, deixando-a mais ácido resistente (21), especialmente se o fluoreto estiver presente no momento do ataque ácido. A presença da camada superficial pseudo-intacta nas lesões cariosas pode ser explicada por este mecanismo conhecido como auto-inibidor ou de reprecipitação (18, 22, 27, 30).

Para que a lesão cariosa ocorra, o biofilme dentário deverá apresentar frequentemente um pH inferior a 5,5 ou estar insaturado em relação aos íons da apatita. A perda mineral subsuperficial culmina clinicamente com o aparecimento da mancha branca (21). Histologicamente a lesão cariosa inicial apresenta quatro

zonas: a camada superficial intacta, o corpo da lesão, a zona escura e a área translúcida. A parte mais externa corresponde à camada superficial que se apresenta relativamente "intacta" e mais mineralizada, é rica em fluoretos e proteínas insolúveis, com um volume de poros menor a 1% (18). O corpo da lesão apresenta maior perda mineral e maior porosidade (5%). A zona escura, observada dessa forma sob microscopia de luz polarizada, contém 2 a 4% de volume de poros (21). Na zona translúcida é possível detectar uma perda mineral seletiva, especificamente de magnésio e carbonato, o que confirma a alta solubilidade destes minerais (18, 31). Esta perda mineral seletiva faz com que a área desmineralizada seja menos solúvel e também pode mudar a gradiente de concentração facilitando a deposição de mineral. Nesta área, observa-se poucos poros (21, 31). Nas áreas mais profundas da lesão do esmalte encontram-se pequenas porcentagens de flúor, magnésio e proteínas. Foi sugerido que isto representa algum grau de remineralização espontânea ou algum processo de reparação natural (18, 31).

O termo remineralização pre supõe um processo de crescimento mineral no qual íons de cálcio e fosfato provenientes da saliva ou de outras fontes tópicas são depositados no dente (14, 24). A remineralização ocorre naturalmente no ambiente bucal quando o desafio cariogênico é detido (24, 27) ou quando há uma supersaturação de minerais no meio bucal (32). O processo de remineralização se baseia na precipitação mineral, onde os íons da saliva são atraídos aos cristais de hidroxiapatita pela carga elétrica da superfície. Alguns autores sugerem que no processo de remineralização também há formação de fases precursoras amorfas que passam por rápidas transformações em hidroxiapatita cristalina (17). O cálcio presente no fluído do biofilme pode interagir com o esmalte, sendo que a velocidade de interação é maior na presença do fluoreto, porém torna a deposição de minerais restrita à superfície (19, 30, 33).

Durante a remineralização, os cristais de hidroxiapatita crescem principalmente em duas direções simultaneamente, promovendo um fenômeno de alongamento e engrossamento do cristal, assim como um aumento da cristalinidade (16, 18); no entanto, são menos organizados que a estrutura original (17).

O processo de precipitação pode-se autolimitar. Por exemplo, se a precipitação ocorrer de forma muito rápida, a taxa de deposição mineral será maior, porém superficial, sem atingir as áreas desmineralizadas mais profundas (17, 25, 33, 34). Por outro lado, se a precipitação for lenta, haverá uma concentração constante

32

de cálcio e fosfato que será dirigida à profundidade da lesão (17, 33). Neste caso, a velocidade de deposição mineral depende da cinética da precipitação que é influenciada por fatores locais como o pH, presença de sementes cristalinas, concentração de flúor, proteínas inibidoras de precipitação, o grau de saturação da saliva em relação à hidroxiapatita e a superfície disponível para o crescimento mineral (17-19, 25, 27, 33-35)

Os modelos de estudo in vitro e in situ são capazes de simular as condições de des-remineralização que ocorrem in vivo e podem ser utilizados para testar a eficácia anticárie de diferentes agentes, dando suporte para o delineamento de ensaios clínicos (28, 36, 37). Os experimentos in vitro são os mais comuns e utilizados pela sua facilidade e aplicabilidade, comparados com os modelos in situ e in vivo, sendo possível obter grande quantidade de informações de forma rápida e altamente padronizada, o que se tornaria difícil, e impossível em alguns casos, com estudos in vivo (25). No entanto, existem limitações uma vez que do ponto de vista biológico, dificilmente os modelos in vitro simulam adequadamente as condições intrabucais, tão diversas e complexas. Portanto, é importante levar essas limitações em conta ao correlacionar os resultados dos estudos laboratoriais com respostas in vivo (25). Os modelos in vitro e in situ utilizam principalmente lesões cariosas produzidas artificialmente, que apresentam características diferentes daquelas encontradas na clínica. Em geral, lesões artificiais são mais superficiais e altamente reativas aos fluoretos. Porém, a camada superficial pseudo-intacta apresenta-se mais fina do que as encontradas clinicamente (36). As lesões artificiais são difíceis de serem criadas, pois qualquer alteração das condições desmineralizantes pode induzir à formação de lesões erosivas e cavitadas (18, 25, 38). As lesões cariosas in vivo remineralizam com menor velocidade que aquelas in vitro (34). Assim, nos modelos in vitro, é possível observar diversos graus de remineralização em um período bastante curto, muitas vezes nos primeiros dias (25, 34, 37). As lesões artificiais em esmalte que apresentam uma maior perda mineral são mais porosas e respondem melhor a soluções remineralizantes em comparação às lesões mais leves, que são mais propensas a sofrer desmineralização adicional (31, 39, 40). Dentre os modelos in vitro, existem os abióticos (sem interação com bactérias) que se dividem em dinâmicos, mais próximos do que ocorre na cavidade oral; ou estáticos. Os modelos bióticos envolvem o biofilme de uma ou diferentes espécies, sendo estas semelhantes às condições orais (41). Estudos in situ são utilizados para

avaliar eficácia de produtos remineralizantes ou comparar diferentes desafios cariogênicos. Apresentam vantagens sobre os estudos *in vitro*, pois possibilitam a presença de saliva humana renovada constantemente e a formação de uma biofilme mais complexo e próximo do que ocorre clinicamente. No entanto, não é possível testar muitas variáveis como nos modelos *in vitro*. Em geral, os estudos *in situ* são conduzidos após os ensaios *in vitro* (28, 42).

As técnicas mais utilizadas para avaliar o grau de remineralização são a microscopia eletrônica de varredura (SEM) (16, 23, 43-47) e de transmissão (TEM) (16, 43, 48), a espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX) (23, 47-49), a microscopia de luz polarizada (50), método quantitativo de fluorescência induzida por luz (QLF) (40), a espectroscopia infravermelha de Fourier (FTIR) (49), a difração de RX (DRX) (16, 23, 43, 51), a microradiografia transversal (TMR) (6, 26, 31, 34, 44, 50, 52), a microtomografia computarizada (micro-CT) (48, 53, 54), microdureza (46) e a nanoindentação (16, 20, 23, 27, 44, 45, 51, 55).

Dentre as técnicas citadas, a microradiografia transversal (transverse microradiography, TMR) (56-59) é considerada "padrão ouro" para o acompanhamento do processo DES/RE. Descrita por Thewlis há mais de 70 anos (60), esta técnica é considerada de grande precisão e alta reprodutibilidade e consiste na exposição de fatias de esmalte ao raio-X, para o posterior análise da densidade mineral, segundo uma escala de cinza (mediante a calibração com um *stepwedge* de alumínio) e em relação a referências previamente determinadas (56).

Apesar da modernização dos modelos e métodos em cariologia, ainda é desafiador trabalhar com diferentes modelos para induzir e quantificar a desremineralização do esmalte. Idealmente, diferentes métodos podem ser combinados tanto para a formação das lesões quanto para a quantificação da perda ou ganho mineral.

2.2 REMINERALIZAÇÃO

Um dos objetivos da odontologia atual é conseguir prever, deter e reverter a progressão das lesões cariosas, se possível de forma não invasiva. Diferentes
estratégias e materiais têm sido desenvolvidos para promover a recuperação mineral e interferir no metabolismo da placa dental (20, 46, 61-64).

O uso de fluoretos na odontologia representa uma das medidas de maior sucesso na saúde preventiva. O principal mecanismo de ação dos fluoretos para prevenir a desmineralização do esmalte se baseia no estímulo à formação da fluorapatita, que requer valores mais baixos de pH do que a hidroxiapatita para sofrer dissociação (19). A aplicação tópica de fluoretos através de produtos como dentifrícios ou vernizes tem demostrado reduzir o desenvolvimento de lesões cariosas (65, 66). No entanto, a exposição contínua a altas concentrações pode causar fluorose, especialmente em crianças (67). Assim como os fluoretos, o fosfato de cálcio amorfo (ACP) estabilizado com o fosfopeptido de caseina (CPP) demonstrou ter efeito anticariogênico (51), podendo agir sinergisticamente com os fluoretos (68). Enquanto os fluoretos disponíveis no biofilme promovem a formação de fluorapatita na presença de íons de cálcio e fosfato (69), o mecanismo de ação do ACP-CPP se baseia na regulação a atividade dos íons cálcio e fósforo do fluído do biofilme, ajudando a manter a supersaturação destes íons diminuindo a desmineralização e promovendo a remineralização do esmalte (70). O ACP, sem a presença do CCP, é bastante instável e se transforma rápidamente em um fase mais termodinâmicamente estável, como a hidroxiapatita ou fluorapatita (61). Após ter sido exposto exposto a pastas contendo ACP-CPP (ToothMouse™, GC Europe, Leuven, Bélgica), o esmalte desmineralizado demostrou aumento da sua dureza, redução na porosidade e sinais de recuperação mineral (51). No geral, dentifrícios (71) e enxaguatórios (72) contendo ACP exibiram resultados melhores de remineralização em comparação a materiais contendo fluoretos. De fato, atualmente existem diversos estudos clínicos que verificaram o potencial remineralizador do ACP em lesões em esmalte (70, 73, 74).

A remineralização de lesões em esmalte é uma prática relativamente previsível e amplamente pesquisada. No entanto, a remineralização da dentina ainda apresenta desafíos a serem superados. A estrutura heterogênea e complexa da dentina precisa de estratégias remineralizadoras capazes de produzir deposição de minerais dentro das fibrilas colágenas degradadas e inibir a ação das metaloproteinasas (MMPs). O desenvolvimento de biomateriais remineralizantes leva em consideração duas abordagens, em geral agrupadas como *top-down* (de cima para baixo) ou *bottom-up* (de baixo para cima). A primeira, e mais utilizada,

consiste na adição de algum nanocomponente que promova a deposição de íons e a penetração destes nas fibrilas colágenas da dentina (75). A segunda abordagem se baseia em um processo conhecido como "cristalização não clássica mediada por partículas" e representa uma nova técnica, chamada remineralização biomimética ou bioremineralização, que procura reconstituir a dentina desmineralizada a partir das regiões mais profundas da lesão utilizando nanopartículas precursoras da hidroxiapatita (por exemplo, o ACP) as quais são estabilizadas por análogos biomiméticos de proteínas não colágenas (43). Ao se comparar ambas as técnicas (*top-down* e *bottom-up*), observou-se um maior aumento do conteúdo mineral dentinário com a técnica *bottom-up* após quatro meses do que com a técnica *top-down* (75).

A técnica da remineralização biomimética pode utilizar vários componentes, dentre eles moléculas polianiônicas, análogos biomiméticos (ácidos policarboxílico ou poliacrílico), o ácido polivinilfosfônico, fluido corporal artificial (*Simulated Body Fluid, SBF*) e ACP, todos com o propósito de simular as funções das proteínas da matriz colágena, inibir o efeito das MMPs ou fornecer íons Ca²⁺ e PO₄³⁻ (76-79). Os objetivos da remineralização biomimética são aumentar o conteúdo mineral (80), mantendo a orientação original dos cristais encontrada na dentina sadia (81), recuperar as propriedades mecânicas da dentina (82) e proteger a rede colágena contra enzimas endógenas (como as MMPs), ácidos bacterianos e outros agressores químicos (83). Alguns estudos relatam que nas primeiras horas já é possível se observar fibrilas colágenas altamente mineralizadas, com cristais hierarquicamente depositados (79, 83-85).

Considera-se que a biomineralização é um processo de desidratação progressiva, visto que o conteúdo mineral aumenta às custas da diminuição da água, a fim de manter um volume constante (86). Por este motivo, a qualidade da união de sistemas adesivos à dentina pode ser melhorada mediante este tipo de remineralização, uma vez que a degradação hidrolítica dos componentes resinosos seria evitada (87, 88). Da mesma forma, a presença de inibidores das MMPs no meio biomimético aumenta a resistência à degradação das fibrilas colágenas (89). Com efeito, o contato com o meio de remineralização biomimético promoveu aumentos no módulo de elasticidade da camada híbrida de até 118% após 4 meses (90), bem como o preenchimento de defeitos nanoscópicos no seu interior (88). A remineralização biomimética se apresenta como uma alternativa promissora para a

recuperação mineral da dentina e da camada híbrida na interface dentina-compósito, o que justifica a intensa atividade de pesquisa observada sobre este tema.

2.3 REMINERALIZAÇÃO COM MATERIAIS RESINOSOS

Diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de compósitos resinosos bioativos contendo fosfatos de cálcio. Entre os ortofosfatos de cálcio mais pesquisados estão o fosfato de cálcio amorfo (ACP) (5, 6, 91, 92), o fosfato dicálcico anidro (DCPA) (10, 93) e o fosfato tri-cálcico (TCP) (94). De modo geral, estes estudos mostram que as concentrações de íons liberadas por compósitos contendo 40 % em peso de fosfato de cálcio atingem níveis de saturação capazes de promover a recuperação do conteúdo mineral de lesões artificiais em esmalte em níveis significativos (6, 91, 93). A remineralização relatada nestes estudos situa-se entre 14% e 38% após 15-30 dias de ciclagem DES/RE. Nos materiais controle (ou seja, sem a adição de fosfato de cálcio), em geral observa-se uma perda adicional de mineral entre 6% e 55% (6, 7, 52).

A liberação de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} por materiais resinosos está relacionada à área superficial das partículas de CaP, presença de agente funcionalizante, porcentagem de CaP no compósito, pH do meio de imersão e hidrofilia da matriz resinosa (12, 13, 54, 92, 94, 95). Dados de diversos estudos mostraram que a liberação após 7 dias situa-se entre 4 ppm e 30 ppm para o íon cálcio e entre 6 ppm e 52 ppm para o hidrogênio fosfato em compósitos contendo entre 11 e 40% (em peso) de CaP (6, 8, 10, 12, 96-98).

Atualmente, é encontrado um compósito comercial contendo partículas de ACP (Aegis, Bosworth Co., Skokie, IL, USA) e o fabricante o indica seu uso em situações com baixa solicitação mecânica, como selante de fóssulas e fisuras, cimento de bandas ortodônticas, restaurações de classe V e base cavitária. O selante contendo ACP apresentou remineralização semelhante ao de um material contendo fluoreto após ciclagem de pH na superfície do esmalte. No entanto, quando analisada a remineralização em profundidade o compósito com ACP mostrou numericamente maior concentração mineral em comparação com os outros

grupos (selante contendo flúor e um cimento de ionômero de vidro modificado com resina) (99).

Uma vez que a adição de partículas de CaP no compósito diminui sua resistência mecânica, diversas estratégias foram avaliadas para contornar este problema e permitir que estes compósitos possam ser utilizados em restaurações com elevada solicitação oclusal. Por exemplo, a associação de CaP com partículas de reforço (63) e whiskers de nitreto de silicio (97) resultou em um aumento da resistência, com valores similares ao de compósitos comerciais. Outras abordagens se basearam na silanização da partícula de fosfato de cálcio (10, 54) ou em alterações da superfície da partícula para melhorar o embricamento mecânico à matriz resinosa (91, 100).

Nanopartículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA foram desenvolvidas com o objetivo de proporcionar o estabelecimento de uma interface mecanicamente resistente com a matriz resinosa de compósitos (11). De fato, foi observado que a funcionalização do DCPD aumentou os valores de resistência à fratura em comparação ao compósito contendo partículas não funcionalizadas. Além disso, um compósito contendo 10 vol% de nanopartículas de DCPD funcionalizadas e 50% vol% de vidrio de bário apresentou resistência à fratura semelhante ao compósito controle contendo 60% de vidro de bário (12) e a um compósito comercial microhíbrido após 28 dias de imersão em água^{*}. A funcionalização não teve efeito negativo sob a liberação de íons Ca²⁺ e HPO4²⁻ (12)^{*}, tendo sido registadas concentrações após 28 dias de imersão de 6,6 ppm para cálcio e 0,6 ppm de hidrogênio fosfato. A capacidade remineralizadora de compósitos contendo nanopartículas de DCPD funcionalizadas.

^{*} Rodrigues MC, Chiari MD, Alania Y, Natale LC, Arana-Chaves VE, Méir M, et al. Ion-releasing dental restorative composites containing functionalized brushite nanoparticles for improved mechanical strength. 2017; trabalho submetido para publicação.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos desta pesquisa foram:

- Avaliar o efeito de compósitos experimentais contendo nanopartículas de DCPD, funcionalizadas com TEGDMA ou não, sobre o conteúdo mineral de lesões artificiais de cárie em esmalte em corpos de prova submetidos à ciclagem DES/RE.
- H₀ (hipótese nula): após a ciclagem DES/RE, o conteúdo mineral das lesões não é afetado pela presença, concentração ou funcionalização das partículas de DCPD no compósito.
- Determinar, ao longo do período da ciclagem de pH, as concentrações de íons cálcio e hidrogênio fosfato presentes nas soluções DES e RE.
- H₀: as concentrações iônicas nas soluções DES e RE não são afetadas pela concentração ou pela funcionalização das nanopartículas de DCPD presentes nos compósitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE CÁLCIO

Nanopartículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD, CaHPO₄ · 2H₂O) funcionalizadas com dimetacrilato de trietileno glicol (TEGDMA) foram sintetizadas através de um processo sol-gel em meio aquoso envolvendo a reação entre nitrato de cálcio, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, e fosfato de amônio dibásico, (NH₄)₂HPO₄ (11). Para a síntese das nanopartículas funcionalizadas, o TEGDMA foi adicionado à solução de (NH₄)₂HPO₄ respeitando-se a relação molar de 0,75 mols de TEGDMA por mol de (NH₄)₂HPO₄ (Apêndice A).

A formação do DCPD foi confirmada em ambas as sínteses através da difractometria de raio-X (International Center for Diffraction Data/Joint Committee on Powder Diffraction Standards, ICDD/JCPDS, PDF 09-0077) (Figura 4.1). A análise elementar detectou 18,8% de carbono para o DCPD funcionalizado, o que corresponde a um teor de TEGDMA de 32% (Apêndice B). Para as nanopartículas não funcionalizadas, o conteúdo de carbono detectado foi 0,2%, abaixo do valor de exatidão (acurácia) do equipamento (0,3%). A distribuição de tamanho dos aglomerados das nanopartículas determinada por difração de luz laser mostrou mediana (D_{50}) de 23 µm (mínimo: 5,6 µm, máximo: 71,0 µm) para as nanopartículas funcionalizadas e 15 µm (mínimo: 4,5 µm, máximo: 50,2 µm) as nanopartículas não funcionalizadas. Para determinação da área superficial, as nanopartículas foram lavadas com 7 mL de acetona e agitadas por 30 min, colocadas 5 min no ultrassom e logo centrifugadas por 3 min. Este processo de lavagem foi repetido cinco vezes e após a última lavagem o material foi colocado em estufa a 37°C até que a acetona evaporasse completamente. Assim, de acordo com o método BET, a área superficial das nanopartículas foi 12 m²/g (funcionalizadas) e 38 m²/g (não funcionalizadas). As nanopartículas em formato de placas e os aglomerados de nanopartículas podem ser observados, respectivamente, nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 4.2) e de varredura (Figura 4.3).



Figura 4.1 - Difractogramas das nanopartículas de DCPD sintetizadas



Figura 4.2 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando as nanopartículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA (A) e não funcionalizadas (B)

Figura 4.3 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando os aglomerados de nanopartículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA (A) e não funcionalizadas (B). Cada uma das placas representa um aglomerado. Note que os aglomerados de DCPD funcionalizado apresentam bordas lisas e cantos arredondados, diferentemente dos aglomerados de nanopartículas não funcionalizadas, que apresentam ângulos arredondados e bordas defeituosas





4.2 PREPARAÇÃO DOS COMPÓSITOS EXPERIMENTAIS

Foram preparados cinco compósitos, todos utilizando uma matriz orgânica BisGMA (2,2-bis[4-(2-hidroxi-3-metacriloxipropoxi)fenil]-propano, lote: contendo MKBP7411V) e TEGDMA na proporção 1:1 (em mols), 0,5% em peso de canforoquinona (lote: S32604) e 0,5% em peso de EDMAB (4-dimetilaminoetil benzoato, lote: MKB69133V). A essa matriz foram adicionadas 10 vol% ou 20 vol% de nanopartículas de DCPD não funcionalizadas ou funcionalizadas. Para determinar a quantidade do DCPD em volume a ser adicionada à matriz resinosa dos compósitos, as nanopartículas tiveram suas densidades mensuradas em um picnômetro a hélio (Ultrapyc 1200e, Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, EUA) obtendo-se 2,4 g/ml para o DCPD não funcionalizado e 1,7 g/ml para o DCDP funcionalizado. Vidros de bário silanizado (D₅₀: 0,5 µm, FGM, Joinville, SC - Brasil) foram adicionados para completar a fração volumétrica de 60 %. Um material controle contendo apenas vidros de bário também foi preparado. Os componentes foram pesados com auxílio de uma balança analítica com precisão de 0,1 mg (Mettler Toledo XS105 Dual Range, Columbus, OH, EUA) e misturados manual e mecanicamente (2500 RPM) sob vácuo com o auxílio de um misturador mecânico planetário (SpeedMixer DAC150.1 FVZ-K, FlackTek Inc. Landrum, SC, EUA). Os compósitos foram armazenados em recipientes protegidos da luz e sob refrigeração até 1 hora antes do uso.

4.3 PREPARO DOS DENTES E PRODUÇÃO DE LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE

Foram utilizados terceiros molares humanos extraídos, livres de cáries e sem trincas visíveis em esmalte (avaliadas em estereomicroscópio), obtidos do Biobanco de Dentes Humanos da FOUSP. Os dentes foram limpos e armazenados em solução salina (NaCl a 0,9%) contendo Timol (0,1%) até o seu uso. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP (SISNEP: 31054214.5.0000.0075, Anexo A). Os dentes foram submetidos a dois cortes transversais, um deles 1 mm acima da junção amelocementária e o segundo corte a 4 mm do primeiro em direção à face oclusal. Foi escolhida a área mais plana e com maior espessura de esmalte para receber os cortes subsequentes, obtendo-se blocos de esmalte com 6 x 4 mm (Figura 4.4). Os blocos foram fixados em uma base de acrílico com cera para incrustação (Kota, São Paulo, SP, Brasil) deixando apenas a superfície da dentina exposta. Esta superfície foi planificada em politriz metalográfica (EcoMet 3000 e AutoMet 2000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) sob refrigeração, utilizando lixas de carbeto de silício de 320 grit (Norton Abrasivos, Guarulhos, SP - Brasil) com o propósito de se obter paralelismo entre esta superfície e a base de acrílico. Em seguida, o bloco foi removido da base e novamente fixado, desta vez com a superfície de esmalte exposta para que esta superfície fosse planificada.

Figura 4.4 - Sequência de cortes para a obtenção do bloco de esmalte. Esquerda: cortes paralelos com 4 mm de distância, transversais ao longo eixo do dente. Centro: Vista superior da fatia do dente. Direita: Cortes paralelos a 6 mm de distância no sentido vestíbulo-lingual



Foram utilizadas lixas de 600 grit (Tatu Hidrolix, SP, Brasil) a fim de se obter um melhor controle do desgaste, que não deveria ultrapassar 300 µm. A quantidade de desgaste foi monitorada utilizando-se um relógio comparador (Mitutoyo No.2119-50, Kanagawa, Japão). Em seguida, todos os blocos passaram por polimento com lixa 1200 grit/P4000 (Microcut[®], Buehler, Lake Bluff, IL, USA) por 2 minutos.

Previamente à produção de cárie artificial, os blocos foram recobertos com esmalte cosmético vermelho nas áreas não planificadas (bordas e ângulos. Uma fina linha central (< 1mm de espessura) também foi protegida com esmalte cosmético com o propósito de utilizá-la como área controle (Figura 4.5).



Figura 4.5 - Bloco protegido com esmalte cosmético, pronto para a produção de lesão cariosa

Lesões cariosas sub-superficiais foram criadas no esmalte mediante a imersão (sem agitação) de cada um dos blocos em 30 ml de solução desmineralizante de Buskes (36) por 12 dias a 37°C (Apêndice C).

4.4 PROCEDIMENTO RESTAURADOR E CICLAGEM DE pH

Antes da aplicação do material resinoso sobre as lesões, uma das áreas laterais ao controle foram recobertas com esmalte cosmético de modo a evitar seu contato com as soluções utilizadas durante a ciclagem de pH (Figura 4.6, Apêndice D). Esta área foi utilizada como "baseline", representando a lesão artificial.

Figura 4.6 - Esquema de disposição das áreas experimentais após da produção de lesão cariosa artificial. A: área de esmalte hígido (sem lesão), B: área da lesão artificial protegida por esmalte cosmético, C: área da lesão artificial que receberá o compósito (à exceção do grupo Sem Tratamento)



Foram definidos seis grupos experimentais de acordo com o compósito aplicado sobre a lesão (Tabela 4.1). Adicionalmente, foi avaliado um grupo controle no qual os blocos de esmalte foram submetidos à ciclagem DES/RE sem receberem nenhum dos compósitos (sem tratamento) a fim de se avaliar exclusivamente o efeito da ciclagem sobre as lesões.

Grupo	Tratamento	n
Sem Tratamento	Sem Tratamento	6
20% NF	20% DCPD NF + 40% bário	7
20% F	20% DCPD F + 40% bário	8
10% NF	10% DCPD NF + 50% bário	8
10% F	10% DCPD F + 50% bário	10
Sem DCPD	60% bário	10

Com o propósito de padronizar o volume do compósito, foi utilizada uma matriz de silicone com uma janela de $3 \times 4 = 2 \text{ mm}$ de espessura (volume: 24 mm³),

a qual foi posicionada sobre a metade exposta da lesão e, em seguida, preenchida com o material. A fotoativação foi realizada com aparelho de luz LED Bluephase N (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) com irradiância de 1200 mW/cm² por 40 segundos (Figura 4.7).

Figura 4.7 - Espécime restaurado com o compósito recobrindo apenas a metade do bloco (A: vista superior, B: vista lateral)



Em seguida, os espécimes foram expostos a um modelo de ciclagem de pH desmineralizante (38) no qual os corpos de prova foram individualmente imersos em 26,4 mL (ou seja, 2,2 mL de solução por mm² de lesão exposta) de solução desmineralizante com pH 5,0 durante 4 h a 37°C. Após a imersão em solução DES, os corpos de prova eram lavados em água e imersos em 13,2 mL (1,1 mL/ mm²) de solução remineralizante com pH 7,0 a 37°C por um período de 20 h, totalizando 24 h (Apêndice D). A cada quatro dias, as soluções foram trocadas por soluções novas. O período total da ciclagem foi de 16 dias (Figura 4.8).



Figura 4.8 - Procedimento experimental utilizado no estudo

4.5 AVALIAÇÃO MICRORADIOGRÁFICA (*TRANSVERSE MICRORADIOGRAPHY*, TMR)

Finalizada a ciclagem, os corpos de prova foram seccionados no sentido do longo eixo do bloco de esmalte, de modo que no mesmo corte fosse possível observar todas as áreas (tratamento, esmalte hígido e lesão inicial). Foi possível obter até três fatias de 0,5 mm por corpo de prova, as quais foram polidas manualmente com lixas de granulação 600 (Tatu Hidrolix, SP, Brasil) sob refrigeração com água até se atingir uma espessura menor do que 0,1 mm, aferida com relógio comparador.

As fatias foram coladas com fita adesiva no porta-amostra do equipamento de TMR (em torno de 20-30 amostras por porta-amostra) (Figura 4.9). Como referência, foi incluído no porta-amostra um padrão de alumínio (*step-wedge*, 14 passos, aproximadamente 30 µm de espessura por passo, 99,9% Al), necessário para a calibração da densidade radiográfica pelo software do sistema. O porta-amostra juntamente com a placa de vidro radiográfica foram colocados na câmara escura do equipamento gerador de raio-X (Softex TMR, Kanagawa, Japão). A placa

radiográfica foi sensibilizada pelo raio-X (20 kV e 20 mA) por 13 min. Após a exposição, a placa foi revelada e fixada manualmente em ambiente escuro a 20°C (7 min em cada uma das soluções). Posteriormente, a placa foi lavada com água corrente (10 min) e seca ao ar.

Figura 4.9 - Porta-amostra contendo as fatias de dente, utilizado no equipamento de TMR (A) e microradiografia (placa de vidro radiográfica irradiada) contendo step-wedge de alumínio ao centro (B)



Para a análise, as placas radiográficas foram colocadas em um microscópio óptico. Primeiramente, foi obtida a curva de calibração da densidade radiográfica utilizando a imagem radiográfica do step-wedge. Em seguida, foram fotografadas as áreas correspondentes ao tratamento e à lesão inicial de cada fatia. As imagens foram fotografadas com aumento de 20x (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com uma câmera CCD (Canon, Tóquio, Japão) acoplada a um computador com software para captura e análise da densidade das imagens (TMR 2012 e TMR 2006 software, Inspektor Research BV, Amsterdã, Holanda) com resolução de 640 x 480 pixels e 256 níveis de cinza (44, 59). No caso de conseguir tirar mais de uma fotografia por área, foi feita a média dos valores das variáveis relacionadas aquele dente. O procedimento de análise consiste na seleção de duas áreas, uma delas correspondendo a um volume mineral igual a zero (cor preta) e outra correspondendo ao esmalte sadio. Em seguida, o software determina a espessura (em micrometros) da fatia que está sendo analisada comparando sua densidade radiográfica com as densidades das diversas espessuras do step-wedge. Com esta informação, associadas aos coeficientes de absorção linear do alumínio (131,5), do material orgânico e água (11,3) e da hidroxiapatita estequiométrica (260,5), a

quantidade de material inorgânico (porcentagem do volume mineral, vol%) presente no esmalte é calculada de acordo com a seguinte fórmula, determinada por Angmar et al. (56):

$$V\% = \frac{100(131,5 t_{a}-11,3t_{f})}{(260,5-11,3)t_{f}}$$
(1)

onde t_f e t_a representam as espessuras da fatia e do step-wedge, respectivamente. O software fornece os valores para as seguintes variáveis (Figura 4.10):

 $1.\Delta Z$ (*unidade: vol%.µm*): é a área sobre a curva (integral) do volume mineral *versus* a profundidade da lesão;

2. Profundidade da lesão (lesion depth, LD, unidade: μm): definida pela distância medida a partir da superfície (0% volume mineral) até a profundidade em que o esmalte volta a apresentar conteúdo mineral igual ou maior que 82,5% que equivale a 95% do conteúdo mineral do esmalte hígido, definido como sendo 87%, segundo Angmar et al. (56), Arends e ten Bosch (58);

3. *Razão ΔZ/LD (R, unidade: vol%):* expressa a média de volume mineral da lesão;

4. Espessura da camada superficial pseudo-intacta (superficial layer, SL, unidade: μm).

A remineralização ($\Delta\Delta Z$, em porcentagem) foi calculada utilizando-se o ΔZ da lesão inicial e da lesão após a ciclagem DES/RE (tratamento), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Delta \Delta Z = (\Delta Z_{\text{lesão inicial}} - \Delta Z_{\text{tratamento}}) / \Delta Z_{\text{lesão inicial}} \times 100\%$$
(2)

Valores negativos indicam desmineralização adicional. A variação na profundidade da lesão (ΔLD) após a ciclagem DES/RE foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Delta LD = (LD_{lesão inicial} - LD_{tratamento})/LD_{lesão inicial}) \times 100\%$$
(3)

Sendo que valores negativos indicam um aumento na LD. A variação da R (ΔR) após a ciclagem DES/RE foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

 $\Delta R = (R_{\text{lesão inicial}} - R_{\text{tratamento}})/R_{\text{lesão inicial}} \times 100\%$ (4)

Desta forma, valores negativos indicam um aumento do volume mineral da lesão. A variação da espessura da camada superficial pseudo-intacta (ΔSL) após a ciclagem DES/RE foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Delta SL = (SL_{tratamento} - SL_{lesão inicial})/SL_{lesão inicial}) \times 100\%$$
(5)

Assim, valores negativos indicam diminuição da espessura da SL.

Figura 4.10 - Imagem capturada da microradiografia (A) e análise realizada pelo software (B). B: 1
Valores das diferentes variáveis determinados pelo software. 2 - Gráfico obtido automaticamente pelo software mostrando o volume mineral em função da profundidade. 3 – Gráfico demostrando a correlação entre a espessura do stepwedge e a transmissão de luz pela placa radiográfica. 4 – Imagem do software representando o reconhecimento dos limites da lesão cariosa. 5 – Gráfico mostrando a seleção das áreas representativas de volume mineral zero e esmalte sadio





4.6 LIBERAÇÃO DE ÍONS

As concentrações de íons cálcio e hidrogênio fosfato nas soluções DES e RE utilizadas na ciclagem de pH dos grupos sem tratamento e os restaurados com compósito contendo DCPD foram determinadas ao término do período de quatro dias em que a solução foi utilizada. Como *baseline*, foram utilizadas as soluções DES e RE inicialmente preparadas, sem exposição os corpos de prova. Como controle adicional, foram analisadas soluções expostas apenas ao compósito em volume equivalente ao usado nas restaurações com o intuito de quantificar os íons liberados pelo material sem a influência do dente.

As alíquotas foram analisadas utilizando-se espectrofotometria (DU 800 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Brea, CA - EUA). A concentração de íons cálcio foi determinada através do método colorímetrico de Patrick et al. (101, 102) no qual o cálcio em solução reage com ácido cloranílico ($C_6H_2Cl_2O_4$) formando um precipitado de cloranilato de cálcio. O precipitado é lavado em álcool isopropílico e dissolvido em uma solução de EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), gerando uma solução de coloração rósea (Apêndice E).

Para a quantificação do hidrogênio fosfato (HPO₄²⁻) foi utilizado o método de Fiske e Subbarow (103). Este método se baseia na reação do fósforo com o ácido molíbdico, formando um complexo de ácido fosfomolíbdico, o qual é reduzido pelo ácido ascórbico formando uma solução de cor azul, cuja intensidade é proporcional ao teor de fósforo inorgânico (Apêndice F). Para todas as leituras foram estabelecidas curvas padrão de ambos os compostos resultantes das reações. Os resultados foram obtidos em ppm (partes por milhão).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com a técnica de TMR foram analisados através de ANOVA de fator único e do teste de Tukey para comparações múltiplas. Os valores de concentração de cálcio e hidrogênio fosfato presentes nas soluções DES e RE foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis, com comparações múltiplas feitas através do teste de Dunn. Em todas as análises, foi adotado o nível global de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 MICRORADIOGRAFIA TRANSVERSAL (TMR)

Os valores de ΔZ (perda mineral da lesão), LD (profundidade da lesão), R (média de perda de volume mineral da lesão) e SL (espessura da camada superficial pseudo-intacta) da lesão inicial, da lesão após a ciclagem DES/RE e as variações percentuais resultantes da ciclagem estão descritos nas tabelas 5.1, 5.2 e 5.3, respectivamente. Os valores de ΔZ , LD, R e SL da lesão inicial foram estatisticamente semelhantes para todos os grupos (p>0,05, Tabela 5.1). Após a ciclagem DES/RE, foram observadas diferenças estatisticamente significantes para ΔZ e LD (p<0,05, Tabela 5.2). O grupo "sem tratamento" (constituído por dentes com lesões não restauradas) apresentou perda mineral significativamente maior que os grupos 20% F, 10% F e "sem DCPD". A profundidade da lesão foi significantemente maior para o grupo "sem tratamento" em comparação com todos os grupos restaurados com compósitos contendo DCPD.

Tabela 5.1 - Médias e desvios-padrão da perda mineral da lesão (ΔΖ), profundidade da lesão (LD), média de perda de volume mineral (R) e espessura da camada superficial pseudointacta (SL) da lesão inicial para os grupos experimentais avaliados. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para cada coluna (ANOVA/teste de Tukey, p<0,05)</p>

Grupos	n	ΔZ (vol%.µm)	LD (µm)	R (vol%)	SL (µm)
Sem tratamento	6	3160 (720) ^A	81 (15) ^A	39 (7) ^A	5,3 (1,7) ^A
20% NF	7	3104 (1015) ^A	69 (15) ^A	42 (8) ^A	5,4 (0,9) ^A
20% F	8	3086 (576) ^A	77 (17) ^A	41 (5) ^A	5,5 (1,7) ^A
10% NF	8	3111 (335) ^A	74 (12) ^A	42 (6) ^A	7,9 (1,6) ^A
10% F	10	3046 (828) ^A	77 (16) ^A	39 (8) ^A	6,0 (1,9) ^A
Sem DCPD	10	2492 (797) ^A	66 (12) ^A	38 (9) ^A	6,0 (1,2) ^A
Média		3000 (712)	74 (15)	40 (7)	6,0 (1,5)

Tabela 5.2 - Médias e desvios-padrão da perda mineral da lesão (ΔΖ), profundidade da lesão (LD), média de perda de volume mineral (R) e espessura da camada superficial pseudo-intacta (SL) da lesão inicial após a ciclagem DES/RE para as condições experimentais avaliadas. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para cada coluna (ANOVA/teste de Tukey, p<0,05)</p>

Grupos	n	ΔZ (vol%·µm)	LD (µm)	R (vol%)	SL (µm)
Sem tratamento	6	3719 (1167) ^A	88 (15) ^A	42 (8) ^A	7,1 (2,7) ^A
20% NF	7	2530 (989) ^{AB}	63 (14) ^B	40 (10) ^A	5,5 (1,1) ^A
20% F	8	2405 (682) ^B	65 (13) ^B	37 (5) ^A	6,3 (2,3) ^A
10% NF	8	2459 (397) ^{AB}	63 (9) ^B	39 (6) ^A	7,4 (2,0) ^A
10% F	10	2341 (551) ^B	64 (12) ^B	38 (6) ^A	6,2 (1,7) ^A
Sem DCPD	10	2334 (882) ^B	68 (14) ^{AB}	34 (8) ^A	6,2 (1,3) ^A

Todos os grupos nos quais as lesões foram recobertas por compósito mostraram recuperação do conteúdo mineral após a ciclagem, com valores variando entre 3% e 23% (Tabela 5.3). Após a ciclagem de pH, os valores de $\Delta\Delta Z$ de ambos os grupos utilizando DCPD funcionalizado foram significativamente maiores comparados ao do grupo sem tratamento, o qual apresentou desmineralização adicional (p<0,05). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre grupos nas demais variáveis analisadas (Δ LD, Δ R e Δ SL). O box-plot (Gráfico 5.1) evidencia a ampla dispersão dos dados, em particular no grupo restaurado com o compósito sem DCPD.

Tabela 5.3 - Médias e desvios-padrão para a remineralização (ΔΔΖ), variação da profundidade da lesão (ΔLD), variação da média de perda de volume mineral (ΔR) e variação da espessura da camada superficial (ΔSL) para cada grupo experimental avaliado. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para cada coluna (ANOVA/teste de Tukey, p<0,05)</p>

Grupos	ΔΔΖ (%)	ΔLD (%)	ΔR (%)	ΔSL (%)
Sem tratamento	-17,1 (25,0) ^B	-10 (21) ^A	-8 (22) ^A	33, 6 (40,7) ^A
20% NF	16,0 (23,1) ^{AB}	6 (23) ^A	6 (15) ^A	6,7 (31,9) ^A
20% F	22,6 (13,6) ^A	13 (17) ^A	10 (16) ^A	11,9 (9,3) ^A
10% NF	20,2 (15,3) ^{AB}	14 (18) ^A	5 (25) ^A	-6,7 (11,6) ^A
10% F	21,4 (11,6) ^A	16 (17) ^A	0 (26) ^A	9,9 (34,4) ^A
Sem DCPD	3,3 (37,9) ^{AB}	-4 (20) ^A	8 (27) ^A	7,3 (34,7) ^A

 $\Delta\Delta Z$: valores negativos indicam desmineralização adicional. ΔLD : valores negativos indicam um aumento na profundidade da lesão. ΔR : valores negativos mostram aumento na média da perda de conteúdo mineral. ΔSL : valores negativos mostram diminuição da espessura da camada superficial.

Gráfico 5.1 - Box-plot mostrando a distribuição dos dados de ΔΔΖ (%) em função dos grupos. O símbolo ■ indica o valor da média e a linha horizontal dentro da caixa, a mediana



A figura 5.2 mostra os valores de recuperação mineral (%) em função da profundidade da lesão. É possível observar a desmineralização acentuada apresentada pelo grupo sem tratamento, com reduções crescentes de volume mineral até a profundidade de 70 μ m. Para o grupo que utilizou o compósito sem DCPD, observa-se alguma remineralização até a profundidade de 30 μ m e desmineralização a partir de 40 μ m. Nos grupos que utilizaram compósitos com DCPD, observou-se remineralização em todas as profundidades, com os valores mais elevados observados entre 20 μ m e 40 μ m.



Figura 5.2 - Distribuição dos valores de recuperação mineral (%) dos grupos em função da profundidade da lesão. Valores negativos indicam desmineralização adicional

Considerando-se que a profundidade média das lesões iniciais foi de 74 μ m, a recuperação de conteúdo mineral também foi avaliada dividindo-as em terços: superficial (de 0 a 25 μ m), médio (de 26 a 50 μ m) e profundo (de 51 a 74 μ m). Na Tabela 5.4 observa-se que a recuperação foi significativamente maior nos primeiros micrometros da lesão para os grupos 20% NF, 20% F, 10% NF e o grupo controle sem DCPD em comparação ao sem tratamento. Por outro lado, nos dois terços mais profundos da lesão (entre 26 e 74 μ m) todos os grupos contendo DCPD obtiveram uma maior recuperação do que o grupo que utilizou o compósito sem DCPD e grupo sem tratamento (H=253,25, p<0,001).

Tabela 5.4 - Médias e desvios-padrão da recuperação mineral (%) em função da profundidade da lesão. Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para cada coluna. Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre as profundidades para um determinado tratamento (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05)</p>

		Recuperação mineral (%)			
Grupos	n	Superficial (0 – 25 µm)	Médio (26 – 50 μm)	Profundo (51 – 74 µm)	
Sem tratamento	6	-1,6 (0,8) ^{Ca}	-7,1 (2,8) ^{Da}	-19,1 (3,5) ^{Ca}	
20% NF	7	3,3 (2,1) ^{Bb}	7,2 (1,4) ^{Ba}	6,1 (2,1) ^{Aab}	
20% F	8	7,8 (3,8) ^{Aa}	11,1 (4,9) ^{Aa}	1,8 (0,4) ^{Bb}	
10% NF	8	7,6 (0,8) ^{Aa}	9,3 (1,0) ^{ABa}	3,5 (2,4) ^{Bb}	
10% F	10	1,7 (1,2) ^{BCb}	9,0 (2,3) ^{ABa}	6,5 (2,9) ^{Aa}	
Sem DCPD	10	7,0 (1,8) ^{Aa}	1,4 (2,6) ^{Cb}	-3,4 (1,4) ^{Cc}	

A figura 5.3 mostra exemplos de imagens das lesões artificiais em esmalte analisadas no estudo. É possível ver um aumento na progressão da lesão no grupo sem tratamento, enquanto a lesão permaneceu estática no grupo tratado com material sem DCPD. Para os grupos tratados com DCPD, é possível notar regressão da lesão independentemente da concentração e da funcionalização.

Figura 5.3 - Imagens de microradiografias do esmalte representando a lesão inicial e a situação após ciclagem DES/RE de cada um dos grupos



5.2 LIBERAÇÃO DE ÍONS

A figura 5.4 mostra as concentrações de cálcio encontradas na solução DES na qual ficaram armazenados apenas os compósitos. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro compósitos em nenhum dos quatro períodos analisados. Em relação ao períodos, com exceção do grupo 20% NF, os demais grupos apresentaram aumentos estatisticamente significantes entre o segundo e terceiro período. Nos primeiros dois períodos, as concentrações detectadas foram inferiores à concentração inicial da solução (52 ppm). No terceiro período, as concentrações encontradas foram numericamente semelhantes à concentração inicial da solução a concentração média foi de 65 ppm, ou seja 25% maior que a concentração inicial (H=32,17, p<0,001).

Figura 5.4 - Concentrações de Ca²⁺ (ppm) detectadas nas soluções DES nas quais apenas o compósito foi imerso. Letras maiúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas entre materiais para o mesmo período. Letras minúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para o mesmo material nos diferentes períodos (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05). A linha tracejada representa a concentração inicial do íon na solução</p>



A figura 5.5 mostra as concentrações de cálcio encontradas na solução RE na qual ficaram armazenados apenas os compósitos. Para um mesmo período da ciclagem não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os quatro compósitos em nenhuma das quatro soluções analisadas, exceto no terceiro período no qual 20% F mostrou uma concentração de cálcio menor que os grupos com 10% de DCPD. De modo geral, semelhante ao encontrado na solução DES, foi observada uma redução numérica na concentração de cálcio entre o primeiro e segundo períodos de ciclagem e aumentos sucessivos entre o segundo e o quarto períodos, com diferenças estatisticamente significantes entre o terceiro e quarto períodos, exceto para o 10% NF (H=57,81; p<0,001). As concentrações detectadas no quarto período foram em média numericamente semelhantes à concentração inicial da solução.

Figura 5.5 - Concentrações de Ca²⁺ (ppm) detectadas nas soluções RE nas quais apenas o compósito foi imerso. Letras maiúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas entre materiais para o mesmo período. Letras minúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para o mesmo material nos diferentes períodos (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05). A linha tracejada representa a concentração inicial do íon na solução</p>



A figura 5.6 mostra as concentrações de hidrogênio fosfato encontradas na solução DES na qual ficaram armazenados apenas os compósitos. De modo geral não foram observadas diferenças na concentração de fosfato entre os compósitos para um determinado período, com exceção do segundo período no qual 20% NF mostrou menor concentração que o 10% F. As concentrações mantiveram-se próximas à concentração inicial da solução principalmente no segundo e terceiro períodos da ciclagem. Apenas para o material contendo 10% NF a concentração encontrada no terceiro período foi estatisticamente maior que a encontrada no quarto período. Para o material contendo 10% F a concentração no segundo período foi estatisticamente superior às concentrações do primeiro e quarto períodos (H=26,04; p<0,05).

Figura 5.6 - Concentrações de HPO4²⁻ (ppm) detectadas nas soluções DES nas quais apenas o compósito foi imerso. Letras maiúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas entre materiais para o mesmo período. Letras minúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para o mesmo material nos diferentes períodos (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05). A linha tracejada representa a concentração inicial do íon na solução. A linha tracejada representa a concentração inicial do íon na solução.</p>



A figura 5.7 mostra as concentrações de hidrogênio fosfato encontradas na solução RE na qual ficaram armazenados apenas os compósitos. As concentrações mantiveram-se próximas à concentração inicial da solução com exceção do segundo e terceiro períodos da ciclagem, nos quais houve uma ligeira redução. Semelhante ao descrito para a solução DES, de modo geral não foram observadas diferenças na concentração de fosfato entre os compósitos para um determinado período, com exceção do quarto período no qual houve diferença entre 20% NF e 10% NF. Para todos os compósitos, foi observado que as concentrações diminuíram entre o segundo e o terceiro período, sendo que para os grupos 20% NF e 10% F os menores valores se mantiveram no quarto período (H=47,877; p<0,001).

Figura 5.7 - Concentrações de HPO4²⁻ (ppm) detectadas nas soluções RE nas quais apenas o compósito foi imerso. Letras maiúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas entre materiais para o mesmo período. Letras minúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para o mesmo material nos diferentes períodos (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05). A linha tracejada representa a concentração inicial do íon na solução</p>



As concentrações de cálcio encontradas nas soluções DES e RE na qual ficaram armazenados os dentes apresentando lesão cariosa, recobertas ou não pelos compósitos experimentais são mostradas nas figuras 5.8 е 5.9. respectivamente. As concentrações de cálcio na solução DES não apresentaram um padrão definido. No primeiro período, apenas o material 10% NF apresentou maior concentração de cálcio que o controle. No segundo período, somente os materiais 10% NF e 10% F apresentaram uma concentração de cálcio semelhante ao controle. No terceiro período todos os grupos apresentaram concentrações semelhantes. Finalmente no quarto período, todos os materiais apresentaram menor concentração de cálcio que o controle, com exceção do 10% NF. Para a solução DES, as concentrações nos segundo e quarto períodos foram maiores que as vistas nos primeiro e terceiro períodos para os grupos controle e 10% F. Já para o grupo 20% NF, os três últimos períodos apresentaram maior concentração que o primeiro período, enquanto o maior valor do 20% F foi visto no segundo período, diferindo dos terceiro e quarto períodos. Por fim, 10% NF mostrou maior concentração nos

primeiros dois períodos em relação aos dois últimos períodos.

Figura 5.8 - Concentrações de íons Ca²⁺ (ppm) detectadas na solução DES em função dos períodos de ciclagem analisados para os grupos experimentais com compósitos contendo DCPD e para o grupo sem aplicação de compósito. Letras maiúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para os diferentes grupos em um mesmo período. Letras minúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para o mesmo material nos diferentes períodos (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05). A linha tracejada representa a concentração inicial do íon na solução</p>



Nas soluções RE foi observado um aumento na concentração de cálcio ao longo do tempo, sendo que no quarto período todos os grupos mantiveram uma concentração próxima à da solução inicial (Figura 5.9). Na comparação entre grupos, em geral os materiais apresentaram concentrações estatisticamente menores que o controle, com exceção do 10% F (primeiro período), 20% NF e 10% F (terceiro período) e 20% F (quarto período). No segundo período, o grupo 10% NF apresentou maior concentração de cálcio que todos os demais grupos, sendo que estes não diferiram entre si. As concentrações nos terceiro e quarto períodos foram maiores que as vistas nos primeiro e segundo períodos para o grupo controle. Já para o grupo 20% NF, o quarto período apresentou maior concentração que os primeiro e segundo períodos, enquanto para o 20% F e 10% NF os três últimos períodos foram superiores ao primeiro período. Por fim, 10% F mostrou maior concentração de cálcio no terceiro período em relação aos dois anteriores.

Figura 5.9 - Concentrações de íons Ca²⁺ (ppm) detectadas na solução RE em função dos períodos de ciclagem analisados para os grupos experimentais com compósitos contendo DCPD e para o grupo sem aplicação de compósito. Letras maiúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para os diferentes grupos em um mesmo período. Letras minúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para o resultado das comparações múltiplas períodos (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05). A linha tracejada representa a concentração inicial do íon na solução</p>



De modo geral, as concentrações de HPO₄²⁻ apresentaram comportamentos que se assemelham ao observado para o cálcio. Na solução DES (Figura 5.10) não se observou um padrão entre materiais ou entre períodos. No primeiro período, 20% F e 10% NF apresentaram maior concentração de fosfato que os demais grupos; já no segundo período, 10% F apresentou maior concentração de fosfato que o grupo 20% NF, sendo ambos semelhantes aos demais grupos. No terceiro período concentrações menores foram encontradas para os grupos 20% NF e 20% F em relação aos demais grupos, sendo que resultado oposto foi observado no quarto período. As concentrações de HPO₄²⁻ nos segundo e terceiro períodos foram maiores que as vistas nos primeiro e quarto períodos para os grupos controle e 10% F. Já para o grupo 20% NF, os três últimos períodos apresentaram maior concentração de fosfato que o primeiro período. Por fim, 10% NF mostrou maior concentração de cálcio nos terceiro período, sendo este diferente dos demais com
exceção do segundo período.

Figura 5.10 - Concentrações de íons HPO₄²⁻ (ppm) detectadas na solução DES em função dos períodos de ciclagem analisados para os grupos experimentais com compósitos contendo DCPD e para o grupo sem aplicação de compósito. Letras maiúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para os diferentes grupos em um mesmo período. Letras minúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para o das comparações múltiplas para o mesmo material nos diferentes períodos (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05). A linha tracejada representa a concentração inicial do íon na solução</p>



Na solução RE (Figura 5.11) a concentração de HPO_4^{2-} apresentada pelos grupos foi numericamente próxima à concentração inicial com exceção do primeiro e terceiro períodos. No terceiro período foi detectada alta concentração para os grupos sem tratamento e 10% F. Na comparação entre grupos, 10% NF apresentou maior concentração de HPO_4^{2-} que os outros grupos, não diferindo de 20% F no primeiro período. No segundo período, nenhuma diferença foi detectada entre os grupos. No terceiro período, os grupos sem tratamento e 10% F liberaram mais fosfato que os demais e no quarto período novamente os grupos 20% F e 10% NF apresentaram maior concentração de fosfato que os grupos sem tratamento e o segundo período para todos os grupos com exceção do 20% DCPD; entre o segundo e o terceiro período

as concentrações aumentaram para todos os grupos com exceção dos grupos 20% F e 10% NF. Entre o terceiro e o quarto período, a concentração de HPO₄²⁻ diminuiu para o controle e 10% F, permaneceu constante para os grupos 20% NF e 20% F e aumentou para o grupo 10% NF.

Figura 5.11 - Concentrações de íons HPO₄²⁻ (ppm) detectadas na solução RE em função dos períodos de ciclagem analisados para todos grupos experimentais com compósitos contendo DCPD e para o grupo sem aplicação de compósito. Letras maiúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para os diferentes grupos em um mesmo período. Letras minúsculas indicam o resultado das comparações múltiplas para o mesmo material nos diferentes períodos (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, p<0,05). A linha tracejada representa a concentração inicial do íon na solução</p>



A figura 5.12 mostra a variação da razão Ca:P nas soluções DES e RE calculada a partir das médias das concentrações de Ca²⁺ e HPO₄²⁻ de todos os grupos avaliados em função dos quatro períodos de ciclagem. Para as soluções nas quais apenas os compósitos ficaram armazenados houve uma redução na Ca:P entre o primeiro e o segundo período, seguido de aumentos sucessivos até atingirem valores muito próximos aos encontrados nas soluções iniciais (DES: 2,2; RE: 2,9). Para os dentes com lesão recoberta por compósito, a redução na Ca:P foi observada entre o primeiro e o terceiro período, novamente atingindo valores próximos aos das soluções iniciais no quarto período. Os grupos "sem tratamento" apresentaram comportamento semelhante, no entanto com valores iniciais e finais de Ca:P muito maiores.

Figura 5.12 - Razão Ca:P calculadas pelas médias das concentrações de Ca²⁺ e HPO₄²⁻detectadas nas soluções DES e RE em função dos períodos de ciclagem analisados para todos grupos experimentais, a exceção do grupo contendo compósito sem DCPD. A linha tracejada representa a razão Ca:P inicial das soluções utilizadas



6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial remineralizador de compósitos contendo nanopartículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA. Os efeitos positivos da funcionalização das nanopartículas com TEGDMA sobre a resistência à fratura de materiais resinosos (em relação ao uso de nanopartículas não funcionalizadas) foram verificados em uma série de estudos (12, 13)^{*}. Os efeitos da funcionalização sobre a liberação de íons, no entanto, mostraram resultados discordantes. Enquanto alguns dos estudos citados não verificaram redução nas concentrações de Ca²⁺ e HPO₄²⁻ liberadas ao longo de 28 dias (13)^{*}, em outro estudo foi verificada uma menor liberação aos 7 dias para os compósitos contendo 20 vol% de DCPD funcionalizado em relação ao material contendo nanopartículas não funcionalizadas (12). Sendo assim, o passo seguinte na avaliação destes compósitos restauradores liberadores de íons foi verificar se seriam capazes de promover a recuperação do conteúdo mineral de lesões subsuperficiais em esmalte. As propriedades mecânicas e a liberação de íons de compósitos experimentais contendo nanopartículas semelhantes às utilizadas no presente estudo foram avaliadas em um estudo anterior^{*}.

Mesmo sendo considerada o "padrão ouro" para a quantificação mineral ao longo da profundidade da lesão em esmalte (57, 58, 104), a TMR é um método destrutivo e costuma apresentar variabilidade considerável nos resultados devido a variações biológicas do esmalte e à heterogeneidade das lesões, mesmo quando estas são preparadas em condições padronizadas (34). De fato, os parâmetros avaliados da lesão pré-tratamento (Tabela 5.1) apresentaram coeficientes de variação entre 18% e 25%. Não obstante, a profundidade média das lesões (74 µm) e a espessura da camada pseudointacta (6,0 µm) estiveram dentro dos valores esperados para o procedimento de desmineralização empregado (36, 38, 59). Da mesma forma, as características apresentadas pelas lesões iniciais foram similares entre os grupos, possibilitando uma comparação mais confiável após tratamento. Após o tratamento, o único parâmetro que apresentou alguma variação relevante

^{*} Rodrigues MC, Chiari MD, Alania Y, Natale LC, Arana-Chaves VE, Méir M, et al. Ion-releasing dental restorative composites containing functionalized brushite nanoparticles for improved mechanical strength. 2017; trabalho submetido para publicação.

entre os grupos foi a profundidade da lesão, menor para os grupos que utilizaram compósitos com DCPD em relação ao grupo sem tratamento, porém semelhante ao grupo que utilizou o compósito sem DCPD.

Quando os dados foram analisados em função das variações observadas em cada corpo de prova antes e após a ciclagem de pH (Tabela 5.3), fica evidente a grande dispersão dos resultados. Como consequência, mesmo tendo-se observado valores de $\Delta\Delta Z$ entre 16% e 23% nos grupos envolvendo compósitos com DCPD, não foi detectada diferença entre estes e o grupo no qual foi utilizado o compósito sem DCPD $(3,3 \pm 37,9\%)$ e em alguns casos mesmo com o grupo controle sem tratamento (-17,1 ± 25,0%). Outros estudos também relataram dispersões bastante elevadas nos grupos controle (ou seja, aqueles utilizando compósitos sem partículas de fosfato de cálcio) (5-7). A elevada dispersão de dados torna a média pouco representativa para expressar o comportamento de uma amostra (105). Não obstante, é importante observar que nos grupos envolvendo compósitos com DCPD 91% das amostras apresentaram remineralização, enquanto que nos grupos "sem DCPD" e "sem tratamento" isso foi observado em 60% e 33% dos corpos de prova, respectivamente. Além disso, não foram verificadas diferenças na remineralização entre os grupos envolvendo compósitos contendo diferentes frações volumétricas de DCPD ou em função da sua funcionalização. Isso parece indicar que a disponibilidade de íons na interface entre o compósito e a superfície da lesão não seria diferente para os compósitos contendo DCPD.

O fato do grupo controle sem DCPD ter apresentado, em média, uma leve remineralização sugere que a aplicação do compósito sobre a lesão por si só representaria uma proteção contra a desmineralização adicional da lesão. Um estudo *in vitro* verificou que a área da lesão formada após imersão em um gel ácido (pH=4,5) por cinco semanas é diretamente proporcional ao comprimento da fenda na interface dente-restauração (106). Portanto, se for considerado que o compósito foi aplicado sobre a lesão em condições de baixo confinamento (ou seja, como um cubo com apenas uma das faces aderidas), é possível que sua contração de polimerização não tenha resultado em tensões capazes de promover o descolamento da interface, mesmo na ausência de um sistema adesivo.

A ausência de diferença estatística entre o grupo "sem DCPD" e os demais grupos, além da alta variabilidade dos dados, se deve à deposição mineral

observada nos primeiros 25 µm da lesão, semelhante ao relatado por Langhorst et al. (6) que utilizaram como controle um compósito comercial microparticulado contendo partículas de trifluoreto de itérbio. Uma hipótese que poderia explicar a recuperação mineral no terço superficial da lesão encontrada mesmo no grupo sem DCPD seria a presença de flúor nas soluções da ciclagem. O flúor é altamente reativo com a hidroxiapatita. Assim, é possível que a deposição de fases minerais com flúor tenham obstruído as porosidades e impedido o transporte de íons ao longo da lesão. Neste sentido, o flúor é menos efetivo para promover a remineralização nas áreas mais profundas (6, 18, 46, 68, 107, 108). Mesmo considerando que em lesões artificiais são necessárias concentrações maiores que 2 ppm de flúor para obter remineralização da superfície (108), e levando-se em conta que nas soluções DES/RE foi utilizado menos de 0,05 ppm de flúor, essas lesões são mais reativas ao flúor (108) e mais favoráveis à remineralização (39, 40) quando pouco profundas (< 100 µm) e com alto R (média da perda do volume mineral, 40 vol%), como no caso do presente estudo. Apesar de não terem sido verificadas diferenças estatisticamente significantes na remineralização entre os grupos com compósito na lesão como um todo, foi observada uma maior recuperação mineral nos terços médio e profundo das lesões nos grupos que utilizaram os compósitos com DCPD em comparação com o grupo sem DCPD.

Muito embora os valores de remineralização encontrados no presente estudo sejam semelhantes aos relatados por outros autores que utilizaram a TMR para avaliar o efeito de compósitos contendo ortofosfato de cálcio sobre lesões não-cavitadas em esmalte (6, 7, 52), existem diferenças de metodologia tais como características da lesão cariosa inicial, formulações da matriz resinosa do compósito, o conteúdo de partículas de ortofosfato de cálcio no compósito e o tipo de ciclagem de pH empregada que podem influenciar nos resultados. Além das diferenças nos parâmetros da ciclagem de pH, os estudos avaliando compósitos com ACP utilizaram uma técnica diferente para o preparo dos corpos de prova, conhecida como técnica da fatia única (*single-section technique*), que tem a vantagem de diminuir a variabilidade no entanto aumenta a susceptibilidade da amostra aos ácidos (110). As características das lesões artificiais em esmalte têm especial importância nos resultados de tratamentos remineralizadores. Lesões iniciais com maior perda mineral respondem com maior sucesso aos tratamentos de

remineralização (*in vitro* ou *in vivo*) (39, 40). Por isso, é importante que estudos sobre remineralização reportem as características iniciais da lesão, em particular o seu conteúdo mineral (ΔZ). Infelizmente, dos três estudos que verificaram a remineralização de lesões em esmalte utilizando compósitos com ACP, apenas um deles traz esta informação (ΔZ : 2060 vol%·µm, LD: 93,2 µm) (52).

A liberação de íons de compósitos contendo ortofosfatos de cálcio está relacionada a vários fatores, entre eles a solubilidade e a área superficial das partículas (10, 93, 100), a quantidade de partículas adicionadas ao compósito (93) e a hidrofilia da matriz resinosa (91). Nos três estudos previamente mencionados (6, 7, 52), os compósitos utilizados apresentavam 40% em peso de ACP e matrizes relativamente hidrofílicas, contendo metacrilato de hidroxietila (HEMA). No presente estudo, valores próximos de remineralização foram obtidos com compósitos contendo quantidades menores de DCPD (23% em peso para os compósitos com 20 vol% e 11% em peso para os compósitos com 10 vol%) em uma matriz relativamente hidrofóbica. Considerando-se que quanto menor a quantidade de partículas de CaP melhores as propriedades mecânicas do compósito (12, 63), os resultados obtidos com compósitos contendo DCPD foram animadores.

Estudos envolvendo ciclagem de pH mostram que a remineralização ocorre de forma mais intensa nas duas primeiras semanas de ciclagem, enquanto que após a terceira semana os sinais de precipitação mineral são praticamente inexistentes (25, 34). A análise da concentração de íons confirma este comportamento, visto que as concentrações inferiores aos das soluções iniciais indicam que houve captação de íons pela lesão e/ou precipitação de mineral sobre os corpos de prova nos três primeiros períodos e uma liberação no quarto período. Em relação às soluções DES e RE usadas na ciclagem, neste estudo a solução DES foi ajustada para pH 5 com um tempo de imersão de 4 horas, em comparação com o pH 4 em 1 hora de imersão da solução nos estudos avaliando compósitos contendo ACP (5, 6, 7). Um outro aspecto que diferencia a ciclagem de pH do presente estudo com a utilizada em trabalhos semelhantes é a concentração de íons das soluções. Por exemplo, neste estudo foram utilizadas na solução DES concentrações de 51,3 ppm de cálcio e 22,9 ppm de fosfato, enquanto que nos estudos anteriores foram utilizadas concentrações de 120 ppm de cálcio e 55,7 ppm de fosfato (5, 6, 7). É importante salientar que em todos os estudos a relação Ca:P foi semelhante (2,13 - 2,15).

78

Um único estudo avaliou a liberação de íons em um compósito contendo 40% em peso de ACP em solução salina e a variação no conteúdo mineral de lesões em contato com este material após 28 dias de ciclagem de pH. A concentração de íons atingiu 29 ppm de Ca²⁺ e 16 ppm de fosfato em solução salina enquanto que a remineralização observada foi de 14 ± 17% (6). Na presente pesquisa foi feita a quantificação das concentrações dos íons Ca²⁺ e HPO₄²⁻ nas soluções DES e RE como forma de se obter alguma informação sobre a variação nas concentrações iônicas ao longo do processo DES/RE. Adicionalmente, foi avaliada a liberação de íons dos compósitos isoladamente também submetidos à ciclagem de pH. A liberação de íons em solução salina (pH 7) de compósitos contendo 10 vol% de nanopartículas de DCPD semelhantes às utilizadas neste estudo foi avaliada em um estudo anterior. O volume e área superficial dos corpos de prova em ambos os estudos foram comparáveis (volume: 20 - 24 mm³ e área superficial: 52 - 55 mm²). Após 28 dias, as liberações acumuladas de Ca²⁺ e HPO₄²⁻ foram, respectivamente, 13 ppm e 1,2 ppm independentemente da funcionalização^{*}. Outro estudo avaliando liberação de íons de compósitos com DCPD em solução salina após 7 dias observou 10 ppm de Ca²⁺ para o compósito com 20 vol% de DCPD e 6 ppm para o compósito com 10 vol% de DCPD (12).

Sabendo-se que os compósitos contendo DCPD efetivamente liberam íons em solução, pode causar surpresa encontrar nas Figuras 5.4 e 5.5 concentrações menores às concentrações iniciais das soluções. Acredita-se que tenha ocorrido a precipitação de compostos de fosfato de cálcio na superfície do compósito. Este comportamento, conhecido como "precipitação espontânea", foi reportado em alguns estudos (100, 111, 112). Cristais com formato de agulha ou de placa foram observados sobre a superfície dos corpos de prova, o que sugere crescimento de hidroxiapatita e brushita, respectivamente (111). Em linhas gerais, nem a funcionalização nem o conteúdo de DCPD tiveram efeito na liberação de cálcio e hidrogênio fosfato. Concentrações menores que a concentração inicial também foram observadas ao avaliar os grupos do conjunto dente-compósito, incluindo o grupo sem tratamento. As variações nas concentrações iônicas nas soluções DES e RE seguiram um mesmo padrão, com algumas poucas exceções. Nos dois primeiros

^{*} Rodrigues MC, Chiari MD, Alania Y, Natale LC, Arana-Chaves VE, Méir M, et al. Ion-releasing dental restorative composites containing functionalized brushite nanoparticles for improved mechanical strength. 2017; trabalho submetido para publicação

períodos da ciclagem na fase RE houve redução na concentração dos íons que pode significar a incorporação dos íons no interior da lesão ou precipitação na superfície da amostra. No geral, para a solução DES observa-se uma absorção ou precipitação dos íons Ca²⁺ e HPO₄²⁻, à exceção de alguns grupos os quais mostraram uma liberação de íons (posto que a concentração é maior à da solução inicial) que podem ter saído ou do dente ou do compósito. Nos últimos dois períodos, tanto para o Ca^{2+} e HPO₄²⁻, na solução DES manteve-se a precipitação; no entanto, o grupo sem tratamento apresenta uma saída significativa de íons, os quais somente poderiam pertencer ao esmalte, portanto poderíamos inferir que houve uma desmineralização mais severa do esmalte. Por outro lado, quando a concentração de íons se mantém geralmente abaixo da concentração esperada na solução sugere-se uma inibição da desmineralização. O grupo 20% F foi um dos que em praticamente todos os períodos e independentemente do tipo de solução, não permitiu a saída de íons. Na solução RE o grupo sem tratamento mostra principalmente uma liberação de íons provenientes do mesmo esmalte. Entretanto, a partir dos valores de remineralização podemos confirmar que houve precipitação de íons no esmalte.

Ao analisar o gráfico onde se mostra a proporção Ca:P e sua variação em função dos diferentes períodos da ciclagem, há uma tendência do Ca:P retornar ao valor inicial no final da ciclagem. A presença de "reservatórios" de cálcio e fosfato sobre o compósito manteria estável a concentração da solução, sugerindo equilíbrio e paralisação da remineralização. Considera-se este comportamento uma limitação do modelo *in vitro* utilizado, uma vez que representa um sistema fechado (interagindo apenas o dente e a solução) diferente da cavidade oral.

Semelhante ao diversos estudos *in vitro* de DES/RE, a metodologia não envolveu a presença e/ou o efeito das proteínas salivares, película adquirida e biofilme, que *in vivo* influenciariam na mineralização do esmalte (22, 27). Mesmo considerando-se as limitações do estudo, os resultados são importantes como "prova de conceito" evidenciando que os compósitos contendo DCPD, funcionalizado ou não, promovem a recuperação mineral e inibem o desenvolvimento de lesões artificiais em esmalte, principalmente nas áreas mais profundas da lesão, conforme colocado por Langhorst et al. (6). Portanto, o comportamento mecânico e a capacidade de remineralização e inibição de lesões cariosas de outras formulações de compósitos contendo fosfatos de cálcio e a sua comparação com outros materiais bioativos, por exemplo, cimentos de ionômero de vidro são matéria de pesquisas futuras.

7 CONCLUSÕES

De acordo com o previamente exposto, foram traçadas as seguintes conclusões:

- Os compósitos contendo nanopartículas de DCPD, funcionalizadas ou não, aplicados sobre lesões artificiais em esmalte recuperaram entre 16 e 23% do conteúdo mineral, após ciclagem de pH. Estes compósitos promoveram uma maior remineralização nas áreas mais profundas da lesão. A hipótese nula foi rejeitada.
- Com raras exceções, as concentrações de íons cálcio e hidrogênio fosfato encontradas nas soluções DES e RE não foram afetadas pela concentração ou pela funcionalização das nanopartículas de DCPD presentes nos compósitos. Portanto, a hipótese nula não pode ser rejeitada.

REFERÊNCIAS^{**}

1. Demarco FF, Corrêa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. Dent Mater. 2012 Jan;28(1):87-101. doi: 10.1016/j.dental.2011.09.003.

2. Rasines Alcaraz MG, Veitz-Keenan A, Sahrmann P, Schmidlin PR, Davis D, Iheozor-Ejiofor Z. Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent or adult posterior teeth. Cochrane Database Syst Rev. 2014 Mar 31;(3):CD005620. doi: 10.1002/14651858.CD005620.pub2.

3. O'Donnell JN, Schumacher GE, Antonucci JM, Skrtic D. Structure-Composition-Property Relationships in Polymeric Amorphous Calcium Phosphate-Based Dental Composites. Materials (Basel). 2009;2(4):1929-59.

4. Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, Antonucci JM. Strong nanocomposites with Ca, PO(4), and F release for caries inhibition. J Dent Res. 2010 Jan;89(1):19-28. doi: 10.1177/0022034509351969.

5. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Improved properties of amorphous calcium phosphate fillers in remineralizing resin composites. Dent Mater. 1996 Set;12(5):295-301.

6. Langhorst SE, O'Donnell JN, Skrtic D. In vitro remineralization of enamel by polymeric amorphous calcium phosphate composite: quantitative microradiographic study. Dent Mater. 2009 Jul;25(7):884-91. doi: 10.1016/j.dental.2009.01.094.

7. Weir MD, Chow LC, Xu HH. Remineralization of demineralized enamel via calcium phosphate nanocomposite. J Dent Res. 2012 Out;91(10):979-84.

8. Chiari MD, Rodrigues MC, Xavier TA, de Souza EM, Arana-Chavez VE, Braga RR. Mechanical properties and ion release from bioactive restorative composites containing glass fillers and calcium phosphate nano-structured particles. Dent Mater. 2015 Jun;31(6):726-33. doi: 10.1016/j.dental.2015.03.015.

9. Arcís RW, López-Macipe A, Toledano M, Osorio E, Rodriguez-Clemente R, Murtra J, Fanovich MA, Pascual CD. Mechanical properties of visible light-cured resins reinforced with hydroxyapatite for dental restoration. Dent Mater. 2002 Jan;18(1):49-57.

^{*} De acordo com Estilo Vancouver.

10. Xu HH, Weir MD, Sun L. Nanocomposites with Ca and PO4 release: effects of reinforcement, dicalcium phosphate particle size and silanization. Dent Mater. 2007 Dez;23(12):1482-91.

11. Rodrigues MC, Hewer TL, Brito GE, Arana-Chavez VE, Braga RR. Calcium phosphate nanoparticles functionalized with a dimethacrylate monomer. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014 Dez;45:122-6. doi: 10.1016/j.msec.2014.08.066.

12. Alania Y, Chiari MD, Rodrigues MC, Arana-Chavez VE, Bressiani AH, Vichi FM, Braga RR. Bioactive composites containing TEGDMA-functionalized calcium phosphate particles: Degree of conversion, fracture strength and ion release evaluation. Dent Mater. 2016 Dez;32(12):e374-e381. doi: 10.1016/j.dental.2016.09.021.

13. Rodrigues MC, Xavier TA, Arana-Chavez VE, Braga RR. Polymer-based material containing calcium phosphate particles functionalized with a dimethacrylate monomer for use in restorative dentistry. J Biomater Appl. 2016 Nov 23.

14. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates in dentistry. J Mater Sci Mater Med. 2013 Jun;24(6):1335-63. doi: 10.1007/s10856-013-4898-1.

15. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. Basel, Switzerland: Karger; 1991.

16. Chung HY, Huang KC. Effects of peptide concentration on remineralization of eroded enamel. J Mech Behav Biomed Mater. 2013 Dez;28:213-21. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.08.004.

17. Arends J, Tencate JM. Tooth Enamel Remineralization. J Cryst Growth. 1981 Mai;53(1):135-47. doi: 10.1016/0022-0248(81)90060-9.

18. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(4):481-95.

19. Rosin-Grget K, Peros K, Sutej I, Basic K. The cariostatic mechanisms of fluoride. Acta Med Acad. 2013 Nov;42(2):179-88. doi: 10.5644/ama2006-124.85.

20. Watson TF, Atmeh AR, Sajini S, Cook RJ, Festy F. Present and future of glass-ionomers and calcium-silicate cements as bioactive materials in dentistry: biophotonics-based interfacial analyses in health and disease. Dent Mater. 2014 Jan;30(1):50-61. doi: 10.1016/j.dental.2013.08.202.

21. Magalhaes AC, Oliveira RC, Buzalaf MA. Bioquímica Básica e Bucal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.

22. Hara AT, Zero DT. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. Dent Clin North Am. 2010 Jul;54(3):455-67. doi: 10.1016/j.cden.2010.03.008.

23. Cao Y, Mei ML, Li QL, Lo EC, Chu CH. Enamel prism-like tissue regeneration using enamel matrix derivative. J Dent. 2014 Dez;42(12):1535-42. doi: 10.1016/j.jdent.2014.08.014.

24. Featherstone JDB. Dental caries: a dynamic disease process Aust Dent J. 2008 Set;53(3):286-91. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x.

25. White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. Adv Dent Res. 1995 Nov;9(3):175-93; discussion 194-7.

26. Kielbassa AM, Oeschger U, Schulte-Monting J, Meyer-Lueckel H. Microradiographic study on the effects of salivary proteins on in vitro demineralization of bovine enamel. J Oral Rehabil. 2005 Fev;32(2):90-6.

27. Moreno EC, Zahradnik RT. Demineralization and remineralization of dental enamel. J Dent Res. 1979 Mar;58(Spec Issue B):896-903.

28. Tenuta LM, Cury JA. Laboratory and human studies to estimate anticaries efficacy of fluoride toothpastes. Monographs in oral science. 2013;23:108-24.

29. Featherstone JD. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. J Dent Res. 2004;83 Spec No C:C39-42. Review.

30. Dorozhkin SV. Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature. World J Methodol. 2012 Fev 26;2(1):1-17. doi: 10.5662/wjm.v2.i1.1.

31. Lynch RJ, Ten Cate JM. The effect of lesion characteristics at baseline on subsequent de- and remineralisation behaviour. Caries Res. 2006;40(6):530-5.

32. Robinson C, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, Boteva E, Kirkham J. Identification of human serum albumin in human caries lesions of enamel: the role of putative inhibitors of remineralisation. Caries Res. 1998;32(3):193-9.

33. ten Cate JM. Remineralization of caries lesions extending into dentin. J Dent Res. 2001 Mai;80(5):1407-11.

34. Exterkate RA, Damen JJ, ten Cate JM. A single-section model for enamel deand remineralization studies. 1. The effects of different Ca/P ratios in remineralization solutions. J Dent Res. 1993 Dez;72(12):1599-603.

35. Kielbassa AM, Gillmann L, Zantner C, Meyer-Lueckel H, Hellwig E, Schulte-Mönting J. Profilometric and microradiographic studies on the effects of toothpaste and acidic gel abrasivity on sound and demineralized bovine dental enamel. Caries Res. 2005 Set-Out;39(5):380-6.

36. Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. Caries Res. 1985;19(6):490-6.

37. Ferracane JL. Models of Caries Formation around Dental Composite Restorations. J Dent Res. 2017 Abr;96(4):364-371. doi: 10.1177/0022034516683395.

38. Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. Braz Dent J. 2008;19(1):21-7.

39. Lynch RJ, Mony U, ten Cate JM. Effect of lesion characteristics and mineralizing solution type on enamel remineralization in vitro. Caries Res. 2007;41(4):257-62.

40. Lippert F, Lynch RJ, Eckert GJ, Kelly SA, Hara AT, Zero DT. In situ fluoride response of caries lesions with different mineral distributions at baseline. Caries Res. 2011;45(1):47-55. doi: 10.1159/000323846.

41. Deng DM, van Loveren C, ten Cate JM. Caries-preventive agents induce remineralization of dentin in a biofilm model. Caries Res. 2005 Mai-Jun;39(3):216-23.

42. Melo MA, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel calcium phosphate nanocomposite with caries-inhibition in a human in situ model. Dent Mater. 2013 Fev;29(2):231-40. doi: 10.1016/j.dental.2012.10.010.

43. Niederberger M, Colfen H. Oriented attachment and mesocrystals: nonclassical crystallization mechanisms based on nanoparticle assembly. Phys Chem Chem Phys. 2006 Jul 28;8(28):3271-87.

44. Buchalla W, Imfeld T, Attin T, Swain MV, Schmidlin PR. Relationship between nanohardness and mineral content of artificial carious enamel lesions. Caries Res. 2008;42(3):157-63. doi: 10.1159/000128559.

45. Jeng YR, Lin TT, Huang JS, Peng SR, Shieh DB. Topical laser application enhances enamel fluoride uptake and tribological properties. J Dent Res. 2013 Jul;92(7):655-60. doi: 10.1177/0022034513488392.

46. Elkassas D, Arafa A. Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. J Dent. 2014 Abr;42(4):466-74. doi: 10.1016/j.jdent.2013.12.017.

47. Narayana SS, Deepa VK, Ahamed S, Sathish ES, Meyappan R, Satheesh Kumar KS. Remineralization efficiency of bioactive glass on artificially induced carious lesion an in-vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2014 Jan-Mar;32(1):19-25. doi: 10.4103/0970-4388.127047.

48. Besinis A, van Noort R, Martin N. Remineralization potential of fully demineralized dentin infiltrated with silica and hydroxyapatite nanoparticles. Dent Mater. 2014 Mar;30(3):249-62. doi: 10.1016/j.dental.2013.11.014.

49. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, De Stefano ED, Prati C. Biomimetic remineralization of human dentin using promising innovative calcium-silicate hybrid "smart" materials. Dent Mater. 2011 Nov;27(11):1055-69. doi: 10.1016/j.dental.2011.07.007.

50. Yang Y, Lv XP, Shi W, Li JY, Li DX, Zhou XD, et al. 8DSS-promoted remineralization of initial enamel caries in vitro. J Dent Res. 2014 Mai;93(5):520-4. doi: 10.1177/0022034514522815.

51. Zhou C, Zhang D, Bai Y, Li S. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate remineralization of primary teeth early enamel lesions. J Dent. 2014 Jan;42(1):21-9. doi: 10.1016/j.jdent.2013.11.005.

52. Skrtic D, Hailer AW, Takagi S, Antonucci JM, Eanes ED. Quantitative assessment of the efficacy of amorphous calcium phosphate/methacrylate composites in remineralizing caries-like lesions artificially produced in bovine enamel. J Dent Res. 1996 Sep;75(9):1679-86.

53. Deyhle H, Bunk O, Muller B. Nanostructure of healthy and caries-affected human teeth. Nanomedicine. 2011 Dez;7(6):694-701. doi: 10.1016/j.nano.2011.09.005.

54. Marovic D, Tarle Z, Hiller KA, Muller R, Ristic M, Rosentritt M, et al. Effect of silanized nanosilica addition on remineralizing and mechanical properties of experimental composite materials with amorphous calcium phosphate. Clin Oral Investig. 2014 Abr;18(3):783-92. doi: 10.1007/s00784-013-1044-x.

55. Bertassoni LE, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW, Jr. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. Caries Res. 2009;43(1):70-7. doi: 10.1159/000201593.

56. Angmar B, Carlstrom D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. J Ultrastruct Res. 1963 Feb;8:12-23.

57. Groeneveld A. Dental Caries. Some aspects of artificial caries lesions examined by contact-microradiography. The Hague: Organization for Health Research TNO. Caries Research Unit; 1974.

58. Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. J Dent Res. 1992 Apr;71 Spec No:924-8.

59. Magalhaes AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. Caries Res. 2009;43(6):474-83. doi: 10.1159/000264685.

60. Thewlis J. The structure of Teeth as shown by X-ray examination. London: Spec. Rep. of the Medical Research Council HMSO; 1940.

61. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. J Dent Res. 2010 Nov;89(11):1187-97. doi: 10.1177/0022034510376046.

62. Paris S, Meyer-Lueckel H. Inhibition of caries progression by resin infiltration in situ. Caries Res. 2010;44(1):47-54. doi: 10.1159/000275917.

63. Xu HH, Moreau JL. Dental glass-reinforced composite for caries inhibition: calcium phosphate ion release and mechanical properties. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Fev;92(2):332-40. doi: 10.1002/jbm.b.31519.

64. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. Dent Mater. 2012 Mai;28(5):561-72. doi: 10.1016/j.dental.2012.01.005.

65. Petersson LG. Fluoride mouthrinses and fluoride varnishes. Caries Res. 1993;27 Suppl 1:35-42. Epub 1993/01/01.

66. Stecksen-Blicks C, Renfors G, Oscarson ND, Bergstrand F, Twetman S. Caries-preventive effectiveness of a fluoride varnish: a randomized controlled trial in adolescents with fixed orthodontic appliances. Caries Res. 2007;41(6):455-9.

67. Celeste RK, Luz PB. Independent and Additive Effects of Different Sources of Fluoride and Dental Fluorosis. Pediatr Dent. 2016;38(3):233-8.

68. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, et al. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. J Dent Res. 2008 Abr;87(4):344-8.

69. ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. Acta Odontol Scand. 1999 Dez;57(6):325-9.

70. Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium Phosphopeptides — Mechanisms of Action and Evidence for Clinical Efficacy. Adv Dent Res. 2012 Set;24(2):41-7. doi: 10.1177/0022034512454294.

71. Papas A, Russell D, Singh M, Kent R, Triol C, Winston A. Caries clinical trial of a remineralising toothpaste in radiation patients. Gerodontology. 2008 Jun;25(2):76-88. doi: 10.1111/j.1741-2358.2007.00199.x.

72. Chow LC, Takagi S, Carey CM, Sieck BA. Remineralization effects of a twosolution fluoride mouthrinse: an in situ study. J Dent Res. 2000 Abr;79(4):991-5.

73. Morgan MV, Adams GG, Bailey DL, Tsao CE, Fischman SL, Reynolds EC. The anticariogenic effect of sugar-free gum containing CPP-ACP nanocomplexes on approximal caries determined using digital bitewing radiography. Caries Res. 2008;42(3):171-84. doi: 10.1159/000128561.

74. Bailey DL, Adams GG, Tsao CE, Hyslop A, Escobar K, Manton DJ, et al. Regression of post-orthodontic lesions by a remineralizing cream. Journal of dental research. 2009;88(12):1148-53. Epub 2009/11/06.

75. Liu Y, Mai S, Li N, Yiu CK, Mao J, Pashley DH, et al. Differences between topdown and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially demineralized collagen scaffolds. Acta Biomater. 2011 Abr;7(4):1742-51. doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.028.

76. Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. Biomaterials. 2008 Mar;29(8):1127-37.

77. Kim YK, Gu LS, Bryan TE, Kim JR, Chen L, Liu Y, Yoon JC, Breschi L, Pashley DH, Tay FR. Mineralisation of reconstituted collagen using polyvinylphosphonic acid/polyacrylic acid templating matrix protein analogues in the presence of calcium, phosphate and hydroxyl ions. Biomaterials. 2010 Set;31(25):6618-27. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.060.

78. Gu L, Kim YK, Liu Y, Ryou H, Wimmer CE, Dai L, Arola DD, Looney SW, Pashley DH, Tay FR. Biomimetic analogs for collagen biomineralization. J Dent Res. 2011 Jan;90(1):82-7. doi: 10.1177/0022034510385241.

79. Qi YP, Li N, Niu LN, Primus CM, Ling JQ, Pashley DH, Tay FR. Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. Acta Biomater. 2012 Fev;8(2):836-42. doi: 10.1016/j.actbio.2011.10.033. 80. Saito T, Toyooka H, Ito S, Crenshaw MA. In vitro study of remineralization of dentin: effects of ions on mineral induction by decalcified dentin matrix. Caries Res. 2003 Nov-Dez;37(6):445-9.

81. Burwell AK, Thula-Mata T, Gower LB, Habelitz S, Kurylo M, Ho SP, Chien YC, Cheng J, Cheng NF, Gansky SA, Marshall SJ, Marshall GW. Functional remineralization of dentin lesions using polymer-induced liquid-precursor process. PLoS One. 2012;7(6):e38852. doi: 10.1371/journal.pone.0038852.

82. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(1):13-29.

83. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, Tay FR. Biomimetic remineralization of dentin. Dent Mater. 2014 Jan;30(1):77-96. doi: 10.1016/j.dental.2013.07.013.

84. Kim YK, Gu LS, Bryan TE, Kim JR, Chen LA, Liu Y, Yoon JC, Breschi L, Pashley DH, Tay FR. Mineralisation of reconstituted collagen using polyvinylphosphonic acid/polyacrylic acid templating matrix protein analogues in the presence of calcium, phosphate and hydroxyl ions. Biomaterials. 2010 Set;31(25):6618-27. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.060.

85. Liu Y, Kim YK, Dai L, Li N, Khan SO, Pashley DH, Tay FR. Hierarchical and non-hierarchical mineralisation of collagen. Biomaterials. 2011 Fev;32(5):1291-300. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.018.

86. Kim YK, Mai S, Mazzoni A, Liu Y, Tezvergil-Mutluay A, Takahashi K, Zhang K, Pashley DH, Tay FR. Biomimetic remineralization as a progressive dehydration mechanism of collagen matrices--implications in the aging of resin-dentin bonds. Acta Biomater. 2010 Set;6(9):3729-39. doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.021.

87. Ye Q, Wang Y, Spencer P. Nanophase separation of polymers exposed to simulated bonding conditions. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Fev;88(2):339-48. doi: 10.1002/jbm.b.31047.

88. Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. J Dent Res. 2009 Ago;88(8):719-24. doi: 10.1177/0022034509341826.

89. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. Dent Mater. 2013 Jan;29(1):116-35. doi: 10.1016/j.dental.2012.08.004.

90. Gu LS, Huffman BP, Arola DD, Kim YK, Mai S, Elsalanty ME, Ling JQ, Pashley DH, Tay FR. Changes in stiffness of resin-infiltrated demineralized dentin after remineralization by a bottom-up biomimetic approach. Acta Biomater. 2010 Abr;6(4):1453-61. doi: 10.1016/j.actbio.2009.10.052.

91. O'Donnell JN, Langhorst SE, Fow MD, Antonucci JM, Skrtic D. Light-cured dimethacrylate-based resins and their composites: comparative study of mechanical strength, water sorption and ion release. J Bioact Compat Polym. 2008;23(3):207-226.

92. Antonucci JM, Skrtic D. Fine-Tuning of Polymeric Resins and Their Interfaces with Amorphous Calcium Phosphate. A Strategy for Designing Effective Remineralizing Dental Composites. Polymers (Basel). 2010 Set 1;2(4):378-392.

93. Xu HHK, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, Antonucci JM. Strong nanocomposites with Ca, PO(4), and F release for caries inhibition. J Dent Res. 2010 Jan;89(1):19-28. doi: 10.1177/0022034509351969.

94. Mehdawi I, Neel EA, Valappil SP, Palmer G, Salih V, Pratten J, Spratt DA, Young AM. Development of remineralizing, antibacterial dental materials. Acta Biomater. 2009 Set;5(7):2525-39. doi: 10.1016/j.actbio.2009.03.030.

95. Xu HH, Moreau JL, Sun L, Chow LC. Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition. Dent Mater. 2011 Ago;27(8):762-9. doi: 10.1016/j.dental.2011.03.016.

96. Dickens SH, Flaim GM, Takagi S. Mechanical properties and biochemical activity of remineralizing resin-based Ca-PO4 cements. Dent Mater. 2003 Set;19(6):558-66.

97. Xu HH, Sun L, Weir MD, Antonucci JM, Takagi S, Chow LC, et al. Nano DCPA-whisker composites with high strength and Ca and PO(4) release. J Dent Res. 2006 Ago;85(8):722-7.

98. Xu HH, Sun L, Weir MD, Takagi S, Chow LC, Hockey B. Effects of incorporating nanosized calcium phosphate particles on properties of whisker-reinforced dental composites. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007 Abr;81(1):116-25.

99. Delben AC, Cannon M, Vieira AE, Basso MD, Danelon M, Santo MR, Stock SR, Xiao X, De Carlo F. Analysis of anticaries potential of pit and fissures sealants containing amorphous calcium phosphate using synchrotron microtomography. Oper Dent. 2015 Mar-Abr;40(2):218-23. doi: 10.2341/13-325-L.

100. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED, Eichmiller FC, Schumacher GE. Physicochemical evaluation of bioactive polymeric composites based on hybrid amorphous calcium phosphates. J Biomed Mater Res. 2000;53(4):381-91.

101. Patrick U, Ferro BS, Ham AB. Práticas de Químicas Biológicas.1963.

102. Ferro PV, Ham AB. A simple spectrophotometric method for the determination of calcium. American J Clin Pathol. 1957;28:208-17.

103. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem. 1925;66(2):375-400.

104. Schmuck BD, Carey CM. Improved Contact X-Ray Microradiographic Method to Measure Mineral Density of Hard Dental Tissues. J Res Natl Inst Stand Technol. 2010 Abr 1;115(2):75-83.

105. Zar JH. Biostatistical Analysis: Prentice Hall; 1999.

106. Turkistani A, Nakashima S, Shimada Y, Tagami J, Sadr A. Microgaps and Demineralization Progress around Composite Restorations. J Dent Res. 2015 Ago;94(8):1070-7. doi: 10.1177/0022034515589713.

107. Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. Caries Res. 2008;42(2):88-97. doi: 10.1159/000113161.

108. Lippert F, Butler A, Lynch RJ, Hara AT. Effect of fluoride, lesion baseline severity and mineral distribution on lesion progression. Caries Res. 2012;46(1):23-30. doi: 10.1159/000334787.

109. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. Chem Rev. 2008 Nov;108(11):4628-69. doi: 10.1021/cr0782574.

110. ten Cate JM, Exterkate RA. Use of the single-section technique in caries research. Caries Res. 1986;20(6):525-8.

111. Meyer JL, Eanes ED. A thermodynamic analysis of the amorphous to crystalline calcium phosphate transformation. Calcif Tissue Res. 1978 Fev 28;25(1):59-68.

112. Marovic D, Tarle Z, Hiller KA, Muller R, Rosentritt M, Skrtic D, Schmalz G. Reinforcement of experimental composite materials based on amorphous calcium phosphate with inert fillers. Dent Mater. 2014 Set;30(9):1052-60. doi: 10.1016/j.dental.2014.06.001.

APÊNDICE A – Síntese das nanopartículas de DCPD (funcionalizadas e não funcionalizadas)

De acordo com a fórmula estequiométrica: Ca(NO₃)₂ · 4H₂O + (NH₄)₂ HPO₄ → CaHPO4 · 2H2O + (NH₄)₂ (NO₃)₂ + 2H₂O

- Preparo da solução precursora de (NH₄)₂ HPO₄ (0,078 mol/L): em um Erlenmeyer, colocar 391,5 mL de água deionizada e adicionar 10,3 g de (NH₄)₂ HPO₄. Manter a solução sob agitação (temperatura ambiente) até a completa dissolução do reagente;
- Preparo da solução precursora de Ca(NO₃)₂ (0,078 mol/L): em um Becker, colocar 393,5 mL de água deionizada e adicionar 18,6 g de Ca(NO₃)₂. Manter em agitação (temperatura ambiente) até a completa dissolução do reagente;
- Apenas para a síntese das nanopartículas funcionalizadas: adicionar 0,75 mols (16,73 g) de TEGDMA à solução de fosfato de amônio, mantendo sempre em agitação. Tampar a abertura do Erlenmeyer com papel filme;
- 4. Para o gotejamento da solução de Ca(NO₃)₂ sob a de (NH₄)₂ HPO₄, é utilizado um tubo de cromatografia, o qual deve perfurar o papel filme da abertura do Erlenmeyer e se manter em tal posição que não encoste no vidro (deve ser fixado ao papel filme com fita crepe para evitar seu deslocamento).
- Após o término da mistura, a suspensão é mantida sob agitação por 24 horas, seguida por 30 minutos de decantação.
- 6. O sobrenadante é removido com cuidado para não perder o precipitado.
- Adicionar 300 mL de água deionizada ao precipitado (no Becker) e manter em agitação por 3 min;
- Acoplar a mangueira da bomba de vácuo na saída lateral de um Kitasato. Com o auxilio de um funil de Büchner e papel filtro, é realizada a filtragem a vácuo. O gel retido no papel filtro é colocado em um Becker com 300 mL de água deionizada. Este procedimento de lavagem e filtragem é repetido 3 vezes;
- 9. Congelar o gel obtido e liofilizá-lo até se obter um pó branco e seco.

O mesmo procedimento foi utilizado para a preparação do DCPD não funcionalizado, exceto pelo fato do TEGDMA não ter sido adicionado à solução de (NH₄)₂HPO₄

APÊNDICE B – Determinação da porcentagem de TEGDMA nas nanopartículas de DCPD

O percentual de carbono detectado nas partículas mediante a análise elementar foi de 18,8% de carbono para o DCPD funcionalizado. Para converter esse valor em porcentagem de TEGDMA ($C_{14}H_{22}O_6$) considera-se que os átomos de carbono representam 58,7% da massa do TEGDMA (M=286 g/mol). Assim, o teor de TEGDMA correspondente à % de carbono determinada na análise elementar pode ser calculado utilizando-se a seguinte formula:

% TEGDMA = $\frac{\% \text{ de Carbono}}{0,587}$

APÊNDICE C – Preparo da solução desmineralizante de Buskes

Reagentes:

- 1. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3 mM)
- 2. KH₂PO₄ (3 mM)
- 3. de ácido láctico (50 mM)
- 4. tetraetil metil difosfonato (TEMDP, 6 µM)
- 5. traços de Timol
- 6. KOH

Procedimento:

- Determinar a volume de solução necessária baseada na área da amostra que será exposta e a número de espécimes. Em seguida, calcular o peso ou volume de cada reagente (de acordo com o peso molecular e a densidade).
- Levar em conta que a pesagem de alguns dos reagentes pode-se ver alterada por serem higroscópicos. Se for o caso, colocar os reagentes no dessecador a vácuo um dia antes;
- Adicionar água deionizada em um Becker. O volume colocado será um 10% a menos do calculado (para evitar que os reagentes sobrepassem o volume desejado);
- No Becker com água e sob agitação, adicionar primeiro o cloreto de cálcio dihidratado até se dissolver completamente, em seguida colocar o fosfato de potássio monobásico e deixar aproximadamente 5 minutos ou até sua completa dissolução;
- 5. Adicionar o ácido láctico, depois o TEMDP e finalmente o Timol;
- 6. No pHmetro, adicionar KOH até que a solução presente pH 5,0;
- Colocar a solução preparada no balão volumétrico e completar com água deionizada até a atingir o volume calculado;

Armazenar e congelar até seu uso. Prévio ao seu uso, manter a solução sob agitação.

APÊNDICE D – Preparo da solução DES e RE para a ciclagem de pH

Reagentes:

DES

- 1. Ca(NO₃)₂•4H₂O (1,28 mM)
- 2. KH₂PO₄ (0,74 mM)
- 3. ácido acético (0,05 M)
- 4. F 0,03 ppm
- 5. KOH

RE

- 1. Ca(NO₃)₂·4H₂O (1,5 mM)
- 2. KH₂PO₄ (0,9 mM)
- 3. KCI (150 mM)
- 4. F 0,05 ppm
- 5. Tris, tris(hidroximetil)aminometano, 0,1 M
- 6. NaOH

Procedimento:

Prévio à preparação, calcular o volume total de solução necessária (em base ao número de amostras e a área a ser exposta à solução) e a partir desse valor, determinar o peso ou volume dos reagentes (calculados com base no seu peso molecular e densidade),

- 1. Em um Becker colocar um volume de água deionizada 10% menor ao calculado e manter sob agitação ;
- Adicionar o Ca(NO₃)₂·4H₂O e esperar até sua completa dissolução. Em seguida, adicionar o KH₂PO₄;
- Incorporar o ácido acético com uma pipeta (para solução DES). No caso da solução RE, adicionar o KCI;
- 4. Adicionar o flúor. Para a solução RE, após o flúor adicionar o Tris;
- 5. Na solução DES adicionar KOH para ajustar o pH a 5,0. Para a RE, ajustar com NaCl o pH até 7,0. Deixar em agitação por aproximadamente 5 min;
- Colocar a solução em um balão volumétrico e adicionar água deionizada até atingir o volume calculado inicialmente;

Armazenar e congelar até seu uso. Prévio ao seu uso, manter a solução sob agitação.

APÊNDICE E – Método colorimétrico de Patrick et al. para determinação da concentração de Ca²⁺ em solução

Reagentes:

- 1. Solução de ácido cloranílico:
 - Dissolver 4 g de NaOH em 700 ml de água destilada;
 - A esta solução, adicionar de 11 g de ácido cloranílico (C₆H₂Cl₂O₄) e água até completar 1 L. Agitar por 10 min ou até sua completa dissolução;
 - O pH deve estar entre 3,5 e 11. Caso esteja acima de 11, adicionar ácido cloranílico a fim de reduzir o pH;
 - Filtrar a solução.
- 2. Álcool isopropílico diluído (50%)
- 3. Solução aquosa de EDTA (5%)
- 4. Solução Padrão, para curva de calibração (10 mg / 100 mL):
- Colocar 0,2497 g de carbonato de cálcio em um frasco de 1 L;
- Adicionar 9 mL da solução diluída de ácido clorídrico (0,1%) e agitar até dissolver o carbonato de cálcio;
- Adicionar água até completar 1 L

Procedimento:

Prévio a cada uma das leituras é feita uma curva padrão. Seguir a sequência de acordo com a tabela abaixo.

1. Transferir 1 mL da amostra para um tubo de ensaio e adicionar 0,5 mL de ácido cloranílico;

Manter em repouso por 30 min e, em seguida, centrifugar 10 min a 5000 RPM Remover o sobrenadante com cuidado de não remover o precipitado.

2. Colocar 3 mL de álcool isopropílico e agitar

Centrifugar (10 min a 5000 RPM) e remover o sobrenadante

- 3. Adicionar 3 mL de solução de EDTA
- 4. Inverter o tubo várias vezes até que o precipitado esteja todo dissolvido
- 5. No equipamento de espectrofotometria, realizar a leitura da curva padrão e em seguida a das amostras. Utilizar o método Cálcio no software (a 520 nm).

Tubos	Padrão Ca	Amostra	Água Deionizada	Ácido Cloranílico	Álcool Isopropílico	EDTA
В	-	-	1 mL	0,5 mL	3 mL	3 mL
1	0,10 mL	-	0,90 mL	0,5 mL	3 mL	3 mL
2	0,20 mL	-	0,80 mL	0,5 mL	3 mL	3 mL
3	0,40 mL	-	0,60 mL	0,5 mL	3 mL	3 mL
4	0,60 mL	-	0,40 mL	0,5 mL	3 mL	3 mL
5	0,80 mL	-	0,20 mL	0,5 mL	3 mL	3 mL
6	1 mL	-	-	0,5 mL	3 mL	3 mL
7	-	1 mL		0,5 mL	3 mL	3 mL
APÊNDICE F – Método de Fiske e Subbarow modificado para determinação de fósforo na solução

Reagentes:

- 1. Solução Padrão de Fósforo 1 µmol/mL
- 2. Solução de TCA (ácido tricloroacético) 1,2 M
 - Dissolver 98,21 g de TCA para 0,5 L
- 3. Solução de molibdato de Amônio 2,5% em ácido sulfúrico 10 N
 - Dissolver 433,1 mL de ácido sulfúrico para 0,5 L
- 4. Solução de ácido ascórbico 1%
 - Preparar só no momento do uso dissolvendo 0,1 g para 10 ml de água destilada

Procedimento:

Prévio a toda leitura é feita uma curva padrão. Seguir a sequência de acordo com a tabela.

- 1. Transferir 1 mL da amostra para um tubo de ensaio, adicionar 1,8 mL de água deionizada e agitar;
- 2. Adicionar 1,5 mL de TCA e agitar;
- 3. Adicionar 0,5 mL de molibdato de amônio e agitar;
- 4. Preparar o ácido ascórbico e adicionar 0,2 mL;
- 5. Agitar e, em seguida, manter em repouso 30 min
- 6. No equipamento de espectrofotometria, realizar a leitura da curva padrão e em seguida a das amostras. Utilizar o método Fósforo no software (a 720 nm)

Tubos	Padrão Ca	Amostra	Água Deionizada	ТСА	Molibdato de Amônio	Ácido Ascórbico
В	-	-	1,8 mL	2,50 mL	0,5 mL	0,2 mL
1	0,05 mL	-	1,8 mL	2,45 mL	0,5 mL	0,2 mL
2	0,10 mL	-	1,8 mL	2,40 mL	0,5 mL	0,2 mL
3	0,20 mL	-	1,8 mL	2,30 mL	0,5 mL	0,2 mL
4	0,30 mL	-	1,8 mL	2,20 mL	0,5 mL	0,2 mL
5	0,40 mL	-	1,8 mL	2,10 mL	0,5 mL	0,2 mL
6	-	1 mL	1,8 mL	1,50 mL	0,5 mL	0,2 mL

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATERIAIS RESINOSOS CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DICÁLCICO DIHIDRATADO (DCPD) FUNCIONALIZADAS COM TEGDMA SOBRE A REMINERALIZAÇÃO E INIBIÇÃO DE LESÕES CARIOSAS IN VITRO

Pesquisador: Yvette Alania Salazar Área Temática: Versão: 1 CAAE: 31054214.5.0000.0075 Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 697.540 Data da Relatoria: 23/05/2014

Apresentação do Projeto:

Estudos com compósitos contendo fosfatos de cálcio mostram que as concentrações de íons liberadas de fosfato de cálcio atingem níveis de saturação capazes de promover a deposição de apatita conseguindo uma recuperação do conteúdo mineral. O objetivo é avaliar o potencial remineralizador e inibitório de um compósito e um adesivo experimentais contendo DCPD funcionalizado com TEGDMA mediante o análise do volume mineral de lesões de cárie artificiais em esmalte, em comparação a materiais comerciais, que não liberam íons. Para a avaliação do potencial remineralizador serão preparados quatro materiais experimentais, sendo dois compósitos restauradores e dois adesivos. Um dos compósitos e um dos adesivos conterão nanopartículas de fosfato de dicálcico dihidratado (DCPD) funcionalizado com TEGDMA, adicionados a uma matriz orgânica contendo BisGMA e TEGDMA. O compósito restaurador terá a fase inorgânica constituída por 40% em volume de partículas de vidro de bário silanizadas e 20% em volume de DCPD. Para o adesivo experimental serão adicionados à matriz apenas as nanopartículas de DCPD, também em 20 % em volume. Serão utilizados 60 dentes terceiros molares humanos que receberão uma camada de esmalte cosmético, deixando exposta uma área de 4 mm x 4 mm na superfície vestibular. Serão criadas lesões cariosas sub superficiais no esmalte

Endereço	Av Prof Lineu Preste	s 2227		
Bairro: C	idade Universitária	CEP:	05.508-900	
UF: SP	Município:	SAO PAULO		
Telefone:	(11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail:	cepfo@usp.br

Página 01 de 04



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 697.540

mediante a imersão dos dentes em 30 ml de solução desmineralizadora com pH inicial a 5,0 por 6 dias a 37°C. Após isso, os dentes serão restaurados de acordo com os seguintes grupos (n=15): G1: restauração com Filtek Z250 + Single Bond 2, G2: restauração com Filtek Z250 + adesivo experimental, G3: restauração com compósito experimental + Single Bond 2, G4: restauração com compósito experimental + adesivo experimental. O adesivo e o compósito serão aplicados e fotoativados com aparelho de fotopolimerização de luz LED Radii-Cal de 1200 mW/cm2 por 15 segundos. Em seguida, o compósito restaurador será aplicado em uma espessura de 2 mm e fotoativado por 40 segundos. Após 24h em água destilada a 37oC, os dentes restaurados serão seccionados e polidos para se obter fatias com uma espessura de aproximadamente 100m. Em seguida, as fatias serão embebidas em resina epóxica e polidas, de modo a deixar exposta apenas a superfície de esmalte. Os 60 conjuntos serão aleatoriamente divididos nos grupos experimentais previamente descritos. Todos os espécimes serão expostos à ciclagem DES/RE. A amostras serão imersas em solução desmineralizante (pH 4,7) durante 2 h, e em solução remineralizante (em pH 7,0) por 22h. A ciclagem será realizada por 28 dias e os corpos de prova serão avaliados a cada sete dias mediante o análise quantitativa do volume mineral por microradiografia transversal (TMR). As radiomicrografias serão obtidas após a formação da lesão cariosa (inicial) e durante a ciclagem DES/RE nos seguintes períodos: 7, 14, 21 e 28 dias. As amostras serão coladas no porta-amostra (em torno de 20-30 amostras/porta-amostra), contendo o padrão de alumínio ("stepwedge"). O porta amostra será inserido juntamente à placa de vidro dentro do gerador de raio X (20 kv e 20 mA) por 20 min. A análise da imagem será realizada utilizando microscópio com câmera CCD. A perda mineral (Z) e profundidade da lesão (m) serão calculadas a partir de valores de cinza de microradiografias padrão usando a fórmula de Angmar et al.(1963). Para a avaliação do potencial inibidor serão coletados 60 terceiros molares humanos nos quais será feito um preparo na face oclusal para logo ser restaurados de acordo com os mesmos grupos e procedimentos descritos na primeira parte. Após ciclagem de pH (des/re) durante 28 días os dentes serão seccionados e polidos até obter fatias de 100m para ser avaliadas mediante TMR. Os dados que apresentem homocedasticidade serão submetidos a análise de variância (ANOVA) a dois critérios. Para comparações entre os grupos, será utilizado o teste de Tukey, com nível global de significância de 5% (p0,05).

Objetivo da Pesquisa:

Tecnicamente os objetivos propostos são:

1)Avaliar o potencial remineralizador de um compósito e um adesivo experimentais contendo DCPD funcionalizado com TEGDMA mediante o análise do volume mineral de lesões de cárie

Endereç	: Av Prof Lineu Preste	s 2227		
Bairro:	Cidade Universitária	CEP:	05.508-900	
UF: SP	Município:	SAO PAULO		
Telefone	: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail:	cepfo@usp.br

Página 02 de 04



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 697.540

artificial não-cavitadas em esmalte, em comparação a materiais comerciais, que não liberam íons. 2) Avaliar o potencial inibitório em relação ao desenvolvimento de lesões de cárie de um compósito e um adesivo experimental contendo DCPD funcionalizado, em comparação a a materiais comerciais que não liberam íons.

Em ambos os casos, será testada a hipótese nula que a remineralização das lesões ou o potencial inibitório não são afetados pela combinação compósito+adesivo utilizada. Adicionalmente, serão determinadas as concentrações de íons cálcio e fosfato liberadas dos materiais experimentais, as quais serão relacionadas ao ganho mineral das lesões ao longo do tempo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Estudo in vitro - risco mínimo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desenvolvimento de novos materiais resinosos no intuito de melhora de desempenho e consequente barateamento de tratamentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto, Declaração de cessão de dentes pelo Banco de Dentes e demais dados do projeto estão adequados.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto pertinente e inovador não apresentando pendências éticas.

Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

 Endereço:
 Av Prof Lineu Prestes 2227

 Bairro:
 Cidade Universitária

 CEP:
 05.508-900

 UF:
 Município:
 SAO PAULO

 Telefone:
 (11)3091-7960
 Fax:
 (11)3091-7814

 E-mail:
 cepfo@usp.br

Página 03 de 04



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 697.540

SAO PAULO, 25 de Junho de 2014

Assinado por: Maria Gabriela Haye Biazevic (Coordenador)

Endereço:	Av Prof Lineu Preste	s 2227	
Bairro: C	idade Universitária	CEP: 05.508-900	
UF: SP	Município:	SAO PAULO	
Telefone:	(11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br	

Página 04 de 04