FLAVIA KAZUE IBUKI

**Síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita
funcionalizadas e análise da interação destas com o tecido dentinário**

São Paulo

2014

FLAVIA KAZUE IBUKI

**Síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita
funcionalizadas e análise da interação destas com o tecido dentinário**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira
Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Hiroshi Toma

São Paulo

2014

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ibuki, Flavia Kazue.

Síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas e análise da interação destas com o tecido dentinário / Flavia Kazue Ibuki; orientador Fernando Neves Nogueira; co-orientador Sérgio Hiroshi Toma. -- São Paulo, 2014. 197 p. : il.: fig., tab., quadros. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais Dentários. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Hidroxiapatita. 2. Nanopartículas - Odontologia. 3. Adesivos dentinários. 4. Biomateriais -- Odontologia. I. Nogueira, Fernando Neves. II. Toma, Sérgio Hiroshi. III. Título.

Ibuki FK. Síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas e análise da interação destas com o tecido dentinário. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a minha família: meu pai, Milton Takunori Ibuki, minha mãe Junko Yamasaki Ibuki, minhas irmãs Fernanda Tiemi Ibuki e Felícia Satie Ibuki e ao Kelvin.

Durante a realização deste trabalho tudo parecia impossível, foram muitas as dificuldades, frustrações e decepções. Às vezes parecia que o esforço e a dedicação não eram suficientes.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** por ter me dado a vida, a minha família e os meus amigos. E por estar sempre ao meu lado não permitindo que eu desistisse diante das dificuldades.

Agradeço ao meu querido **Pai, Milton Takunori Ibuki**, que foi o responsável por tudo que eu conquistei até hoje. Graças aos seus ensinamentos consegui chegar aonde cheguei. Desde cedo aprendi com o senhor a importância dos estudos. Infelizmente o senhor foi embora muito cedo não podendo presenciar momentos como este. Sei que continua comigo mas daria tudo para poder te ver orgulhoso de mim com esta conquista e poder te dar um abraço de agradecimento dizendo que o senhor foi o responsável por eu conseguir chegar até aqui.

Agradeço à minha querida **mãe, Junko Yamasaki Ibuki**, pelo carinho e dedicação. Por me apoiar nas minhas decisões, por não me deixar fraquejar nos momentos de dificuldades, por ouvir os meus desabafos e por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegria e de dificuldades. Agradeço pelos colos, abraços e palavras de carinho quando eu mais precisei. Mãe a senhora é um exemplo para mim e agradeço por tudo que a senhora fez por mim até hoje.

Agradeço à minha **irmã, Felícia Satie Ibuki**, por me apoiar, pelos conselhos, por me ajudar sempre em tudo, pela paciência, por ter ficado de madrugada lendo a minha tese e corrigindo os erros de português. Obrigada por toda dedicação.

Agradeço à minha **irmã, Fernanda Tiemi Ibuki**. Você foi essencial para a conclusão deste trabalho. Obrigada pelas caronas, por me levar até a faculdade, por me buscar nos dias que tive que sair tarde por causa dos experimentos, por às vezes ter que me esperar terminar mesmo estando cansada depois de um dia de trabalho (e sempre com boa vontade e bom humor). Obrigada por me levar aos finais de semana e feriados que tive que ir até a faculdade. Obrigada pelo carinho com que sempre me tratou, por ouvir os meus desabafos, por estar sempre pronta pra me ajudar, por me fazer dar risada nos dias difíceis e pelo apoio financeiro. Não tenho palavras pra agradecer tanta dedicação e companheirismo.

Agradeço ao **Kelvin** pelos 12 anos de companheirismo e amor incondicional, só quem me conhece sabe o quanto foi difícil a conclusão deste trabalho longe do Kelvin. E ao **Oliver** por encher a minha vida de alegria e permitindo que eu conseguisse chegar até o final mesmo com a perda do Kel.

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Fernando Neves Nogueira**, por sempre acreditar em mim. Aprendi muito com você durante todos estes anos e acredito que você é o responsável por grande parte do meu amadurecimento. Depois destes quase 10 anos trabalhando juntos, foram muitos os aprendizados mas mais do que isso obrigada pela amizade. Obrigada pelo carinho com que sempre me tratou, pela paciência, pelos conselhos e pelas oportunidades.

Agradeço ao meu co-orientador, **Sérgio Hiroshi Toma**, pela ajuda e explicações. Pela dedicação e paciência com que me ensinou todos os procedimentos de síntese e caracterização.

Agradeço ao **Prof. Henrique Eisi Toma** por permitir o uso do laboratório e dos equipamentos para o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço ao **Prof. Koiti Araki** pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho e pelo carinho e atenção com que sempre me tratou. Além de permitir o uso do laboratório e dos equipamentos.

Agradeço ao **Douglas Nesadal** pela amizade, carinho, por sempre ouvir os meus desabafos, por me consolar nos momentos de fraqueza, pelos ensinamentos e pelas conversas. Te considero como um segundo pai para mim.

Agradeço ao **Prof. José Nicolau** pelo carinho e ensinamentos.

Agradeço ao meu amigo **André De Vito**, pela amizade, pelos conselhos e pelo carinho com que sempre me tratou. Pelas conversas e risadas aos sábados no consultório. Adoro trabalhar com você e espero poder continuar por muitos anos. Não tenho palavras para agradecer o quanto você me ajudou durante este trabalho, não só me dando força mas também conselhos de uma pessoa super inteligente e experiente que você é.

Agradeço à **Rosa Cristina Nogueira (Rosinha)** pelos conselhos e por me amparar quando meu orientador estava longe. Você não tem ideia de como foram importantes aqueles abraços quando a única coisa que eu precisava era de um abraço.

Agradeço imensamente ao **Prof. Igor Studart** que foi como um segundo orientador para mim. Me acolheu com muito carinho e paciência dentro do seu

grupo GBD e me orientou durante a ausência de meu orientador. Professor o senhor é uma pessoa que eu admiro e com quem aprendi muito durante as reuniões de grupo. Desculpe pelas muitas lágrimas de desespero que derramei durante as reuniões.

Agradeço ao membros do grupo GBD, **Ricardo Sgura, Fernando Taddeo, Profa Maristela, Mariana, Natália, Sabrina e Bárbara** por me receberem no grupo e nas reuniões e sempre me tratarem com muito carinho.

Agradeço ao **Antônio Lascala**, técnico do departamento, por sempre estar pronto a me ajudar, tirando minhas dúvidas de forma sempre carinhosa e solícita.

Agradeço à **Ana Carolina Romero** pela amizade verdadeira que desenvolvemos durante este período de pós graduação. Foi muito bom poder trabalhar na bancada com você, escrever artigos e o mais importante ter você como minha amiga. Obrigada por chorar comigo nos momentos difíceis e por me alegrar com suas piadas e risadas.

Agradeço à **Danielle Carvalho** pela amizade e forma carinhosa com que sempre me tratou. Obrigada por me consolar nos momentos difíceis e por me alegrar com seu bom humor.

Agradeço à **Flavia Pires Rodrigues** pela AMIZADE. Amizade em letras maiúsculas, pois só uma amiga de verdade faz o que você fez por mim. Jamais vou me esquecer. É muito difícil encontrar pessoas de tão bom coração como você. Em um momento de desespero você me ajudou prontamente, mesmo sendo uma pessoa com tantas coisas para fazer. Sem você com certeza esta tese teria sido perdida, e eu estaria reescrevendo tudo o que foi perdido. Não tenho palavras para te agradecer.

Agradeço ao **Prof. Rafael Ballester** pelo carinho e paciência. Muito obrigada por toda ajuda, orientação e disponibilidade.

Agradeço à **Profa Alyne Simões** pela amizade e pelo carinho com que sempre me tratou.

Agradeço ao **Prof. Walter Miranda Jr.** não só por ter disponibilizado o dispositivo para a realização do teste de cisalhamento mas também pelo carinho com que sempre me tratou.

Agradeço ao **Prof. Roberto Braga** por disponibilizar, sempre de maneira solícita e atenciosa, as resinas compostas para realização deste trabalho.

Agradeço ao **Prof. Victor Arana** por me ajudar com as microscopias sempre de maneira solícita.

Agradeço aos professores do departamento: **Prof. Paulo Francisco César, Profa. Josete Meira, Prof. Paulo Capel, Prof. Leonardo e Prof. Carlos Francci.**

Agradeço à **Tathy Xavier** por sempre estar disposta a me ajudar. Muito obrigada pelas dicas e conselhos. Muito obrigada por ouvir os meus desabafos e me consolar.

Agradeço aos colegas de pós graduação **Juliana Castro, Érika, Marcela Rodrigues, Lucas Pabis, Lucas Hian, Karen Fukushima, Ana Carolina Freitas, Bruno Lopes e Alexander Nishida** pela amizade e companhia durante todo este período.

Agradeço à **Elidamar Guimarães** pelo carinho e atenção.

Agradeço à **Capes** pelo apoio financeiro.

RESUMO

Ibuki FK. Síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas e análise da interação destas com o tecido dentinário [tese] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida

A hidroxiapatita (HA) é o principal constituinte mineral de ossos e dentes, e têm sido foco de grande interesse na biomedicina devido sua excelente biocompatibilidade e bioatividade, em especial para aplicação em implantes dentários e ortopedia. Na odontologia estudos mostram o sucesso do uso de nanopartículas (NP) de HA para tratamento de hipersensibilidade dentinária, remineralização de lesões de cárie em esmalte, reparação e prevenção de lesões de erosão iniciais. No entanto, existem evidências que o tamanho do cristal desempenha um papel essencial na formação dos tecidos duros e possui significativa influência nas propriedades intrínsecas destes cristais, incluindo solubilidade e, consequentemente, biocompatibilidade. Este trabalho teve como objetivo verificar a síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas e avaliar a influência de sua aplicação no processo adesivo em dentina. Nanopartículas de HA com diferentes tamanhos e morfologia foram sintetizadas pelo método de precipitação em solução aquosa. Foi investigada a influência de dois novos ligantes, ácido deoxicólico (AD) e ácido abiético (AB), no preparo da NP de HA. As NP foram caracterizadas através das análises de espectroscopia por dispersão de raios X (EDX), Difratometria de Raios X (DRX), Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia de Força Atômica (AFM). Os resultados mostraram que a adição destes ligantes alteram a morfologia mas não o arranjo cristalino da HA. Para o estudo da interação das NP de HA com o colágeno foi utilizado a NP modificada por AD. Para esta análise da influência da aplicação destas NP durante o procedimento adesivo, foram utilizados dentes bovinos. Os dentes bovinos foram separados em quatro grupos Controle (C), Controle termociclado (CTC), nanopartícula funcionalizada com ácido deoxicólico (AD) e Deoxicólico termociclado (ADTC). Foi realizado o teste de cisalhamento 24 horas após a realização do procedimento adesivo e após a termociclagem (10 000 ciclos). Foram realizadas imagens da interface

adesiva antes e depois da termociclagem, através da Microscopia Confocal Raman. Os resultados mostraram um aumento nos valores da resistência de união inicial do grupo AD quando comparados ao grupo C, e a manutenção do valor após a ciclagem térmica no grupo ADTC que foi estatisticamente superior ao grupo CTC ($p < 0,05$). Não foi observada alteração no padrão da camada híbrida formada, mostrando um possível benefício da utilização deste nanomaterial na odontologia.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. Nanopartículas. Dentina. Adesão.

ABSTRACT

Ibuki FK. Synthesis and characterization of functionalized hydroxyapatite nanoparticles and analysis of the interaction in dentin. [thesis] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida

Hydroxyapatite (HA) is the major mineral component of bones and teeth, and has been the focus of great interest in biomedicine because of its excellent biocompatibility and bioactivity, in particular for application in dental and orthopedic implants. In dentistry studies have shown the successful use of nanoparticles (NP) of HA for the treatment of dentin hypersensitivity, remineralization of caries lesions in enamel, repair and injury prevention of initial erosion. However, there is evidence that the size of the crystal plays an essential role in the formation of hard tissues and has significant influence on the intrinsic properties of these crystals, including solubility and biocompatibility. This study aims to verify the possibility of functionalized hydroxyapatite nanoparticles and evaluate possible benefits of using these during the adhesive process in dentin. HA with different sizes and morphology were synthesized by precipitation method in aqueous solution. Furthermore, the influence of two new ligands, deoxycholic acid (AD) and abietic acid (AB) in the preparation of HA NP were investigated. The NP were characterized by analysis of EDX, DRX, DLS, TEM, MEV and AFM. The results showed that the addition of these ligands change the morphology but not the crystalline arrangement of HA. To study the interaction of NP of HA with collagen, NP of HA modified with AD was used. Bovine teeth were used to analyse the influence of using these NP during bonding procedures. The bovine teeth were divided into four groups: control (C), thermocycled Control (CTC), deoxycolic (AD) and deoxycolic thermocycled (ADTC) groups. The shear test was performed 24 hours after the adhesive procedure and after thermocycling (10,000 cycles). The adhesive interface images were performed before and after thermocycling by confocal Raman spectroscopy. The results showed an increase in initial resistance values of AD group when compared with group C, and no reduction in value after thermal cycling at ADTC group, which occurred in the CTC group. No change in the pattern of the hybrid layer was observed, showing a possible benefit of use this nanomaterial in dentistry.

Keywords: Hydroxyapatite. Nanoparticles. Dentin. Adhesion.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Biomateriais	19
2.1.1 Classificação.....	19
2.2 Fosfatos de cálcio.....	23
2.3 Apatitas.....	27
2.4 Hidroxiapatita	29
2.4.1 Características químicas da hidroxiapatita	31
2.4.2 Estrutura e características cristalográficas da hidroxiapatita	32
2.4.3 Não estequiometria da hidroxiapatita.....	39
2.4.4 Solubilidade da hidroxiapatita	41
2.5 Hidroxiapatita nanoparticulada	41
2.6 Rotas de síntese da hidroxiapatita.....	47
2.6.1 Reações em meios não aquosos ou métodos secos.....	48
2.6.2 Reações em meios aquosos ou método via úmida	50
2.7 Métodos de modificação da síntese.....	57
2.8 Composição e características morfológicas do esmalte e da dentina	61
2.9 Adesão.....	64
3 PROPOSIÇÃO	73
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.1 Síntese de Hidroxiapatita	74
4.2 Adição de ligantes	78
4.3 Caracterização das hidroxiapatitas sintetizadas	79

4.3.1 Espectroscopia por dispersão de raio X	80
4.3.2 Difractometria de Raio x	86
4.3.3 Espalhamento de Luz Dinâmica	87
4.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão	89
4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	89
4.3.6 Microscopia de Força Atômica.....	90
4.4 Interação da hidroxiapatita sintetizada e as fibras colágenas expostas da dentina	94
4.4.1 Microscopia Confocal Raman	95
4.4.2 Cisalhamento	105
4.4.3 Envelhecimento	111
4.4.4 Análise estatística	113
5 RESULTADOS	114
5.1 Caracterização das hidroxiapatitas sintetizadas	114
5.1.1 Espectroscopia por Dispersão de Raios X (EDX)	114
5.1.2 Difractometria de Raios X (DRX)	118
5.1.3 Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS)	119
5.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	122
5.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	124
5.1.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)	126
5.2 Interação das hidroxiapatitas sintetizadas e as fibras colágenas expostas da dentina	127
5.2.1 Análise da interface adesiva em microscópio confocal Raman ..	128
5.2.2 Resistência ao Cisalhamento antes e depois da ciclagem térmica	142
6 DISCUSSÃO	143

7 CONCLUSÕES	155
REFERÊNCIAS	156
ANEXOS	196

1 INTRODUÇÃO

Antes da criação da técnica de condicionamento ácido de esmalte e dos sistemas adesivos, a restauração de cavidades na odontologia era realizada através de retenções macro mecânicas. Nestes casos as cavidades precisavam ter uma conformação retentiva, e esta exigência limitava a preservação de tecido dental sadio. Com o advento dos sistemas adesivos os preparos cavitários tornaram-se mais conservadores, preservando o máximo de estrutura dental sadia.

Em 1955, Buonocore provou que a retenção da resina, quando aplicada sobre a área do esmalte pré-tratada com ácidos, era maior do que aquela obtida quando o material era aplicado sobre o esmalte não-tratado. Desde então a adesão ao esmalte é alcançada de maneira satisfatória e bastante previsível (1). Os valores de resistência de união mensurados em esmalte são sempre altos, indicando durabilidade das restaurações (2). Em contrapartida, a adesão em dentina é ainda um grande desafio.

A dentina, devido à presença de grande quantidade de matéria orgânica (30% em volume) e água (20% em volume) em sua composição (3) é considerado um substrato complexo. Com a presença de matriz orgânica e água faz surgirem diversos fatores complicadores que tendem a degradar a interface adesiva ao longo do tempo. O condicionamento ácido em dentina leva a exposição das fibrilas colágenas, que por sua vez necessitam de um ambiente úmido para que não haja um colapsamento destas fibras o que dificultaria a infiltração dos monômeros resinosos hidrofóbicos. A presença de umidade exige o uso de sistemas adesivos constituídos de monômeros hidrofílicos. No entanto, devido a esta complexidade a adesão em dentina é considerada crítica.

Desde o surgimento da Odontologia Adesiva, apesar dos avanços alcançados pelos sistemas adesivos até hoje, a interface adesiva continua sendo a área de maior fragilidade das restaurações em dentina. Pigmentação e má adaptação marginal com subsequente perda de retenção da restauração ao longo do tempo são indícios clínicos frequentes de falhas na interface (4, 5). Apesar de estudos mostrarem excelente efetividade da adesão imediata e a curto prazo dos sistemas adesivos (6), a longevidade e a estabilidade da

interface adesiva em dentina a longo prazo permanece questionável (7-11). Para que o objetivo restaurador seja alcançado de maneira satisfatória, é essencial a formação de uma interface adesiva sem falhas, já que esta é a responsável pela união dos compósitos à superfície dental, seja de dentina ou esmalte. Muitos estudos mostram que a adesão entre resina e dentina obtida pelos adesivos dentinários hidrofílicos falham com o tempo devido a problemas provenientes de uma má estruturação da camada híbrida (12-19). As falhas podem estar associadas a incompleta infiltração dos monômeros resinosos no interior da matriz dentinária, resultando em uma camada híbrida com fibrilas colágenas expostas e portanto susceptíveis à hidrólise (14, 20-23). Além disso os monômeros hidrofílicos são alvos da hidrólise por sorção de água (13) e formam polímeros mais frágeis (24-26). O emprego do ácido fosfórico pode ser responsável pela reativação de enzimas collagenolíticas, como as metaloproteinases, antes inativadas pela deposição dos cristais de hidroxiapatita (27-30), que atuam sobre o colágeno exposto e que não foi infiltrado pelos monômeros (29, 31-33).

O uso de biomateriais, e conseqüentemente, estudos envolvendo não apenas novos biomateriais mas também desenvolvimento de novas técnicas de síntese têm aumentado nos últimos anos (34). Dentre os biomateriais atualmente disponíveis, as biocerâmicas têm sido utilizadas com sucesso no corpo humano.

A hidroxiapatita sintética é o biomaterial cerâmico à base de fosfato de cálcio mais estudado e mais utilizado para aplicações clínicas como substitutos ósseos. Tal fato se deve principalmente à sua semelhança com a hidroxiapatita presente no organismo e suas características como: biocompatibilidade, ausência de reações adversas, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, baixa toxicidade seja local ou sistêmico, capacidade de ligação ao tecido do hospedeiro (bioatividade) e propriedade osteocondutora, induzindo a regeneração tecidual. A hidroxiapatita já é considerada um ótimo biomaterial com excelentes propriedades, porém a literatura mostra que o tamanho da partícula de HA influencia bastante, não só na formação dos tecidos duros como também nas propriedades intrínsecas do biomaterial como solubilidade e conseqüentemente, biocompatibilidade (35, 36).

A utilização de HA nanoparticulada em aplicações médicas existe desde 1970 (37), e tem ganhado, cada vez mais, ampla aceitação (38). Reposição de tecido ósseo, preenchimento de defeitos ósseos, guia de regeneração ou como recobrimento de superfície de implantes metálicos para acelerar o processo de cicatrização são alguns exemplos de seu uso na medicina (39-41). Estudos têm mostrado que biomateriais a base de HA nanoparticulada apresentaram melhor biodegradabilidade (42, 43) e uma bioatividade muito maior (44, 45) quando comparadas com as cerâmicas de escala micrométrica.

A hidroxiapatita nanoparticulada também já vem sendo utilizada na odontologia para tratamento de hipersensibilidade dentinária (46), remineralização de lesões de cárie em esmalte (47-51), reparação e prevenção de lesões iniciais de erosão (52) e na formulação de adesivos resinosos (53, 54).

No entanto se formos analisar os estudos citados anteriormente, todos mostram a utilização de partículas de hidroxiapatita pura e além disso, poucos estudos mostram aplicação de nanopartículas de hidroxiapatita para remineralização de lesões em dentina (48, 55-57).

Diante do exposto, se pudesse utilizar nanopartículas de hidroxiapatita durante o procedimento adesivo, poderíamos proteger o arcabouço colágeno da degradação.

Dessa forma, este trabalho objetivou sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas e avaliar a influência da aplicação destas durante o procedimento adesivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura será dividida nos seguintes tópicos: biomateriais, hidroxiapatita, hidroxiapatita nanoparticulada, rotas de síntese da hidroxiapatita, métodos de modificação da síntese, composição e características morfológicas do esmalte e da dentina e adesão.

2.1 Biomateriais

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas, realizada em 1982, biomateriais são: “Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (58, 59). Os biomateriais têm como principal objetivo fazer interface e interagir com os sistemas biológicos a fim de tratar, restaurar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (60, 61).

2.1.1 Classificação

Devido ao aumento na diversidade de substâncias e técnicas utilizadas para síntese dos biomateriais, além dos diversos aspectos envolvidos na interação destes com os mais variados tecidos biológicos, encontrou-se a necessidade de classificá-los em diferentes grupos, de acordo com a composição química ou de acordo com seu comportamento biológico. A classificação quanto a composição química se dá de acordo com a origem e

propriedades intrínsecas do biomaterial. Já a classificação quanto ao comportamento biológico está relacionada à resposta biológica causada após a sua utilização (59).

2.1.1.1 classificação quanto à composição química

Quanto a composição química, podemos ter biomateriais metálicos, cerâmicos, poliméricos (naturais ou sintéticos) e compósitos.

Os biomateriais metálicos geralmente são utilizados devido as suas boas propriedades mecânicas (resistência e dureza) (62). Alguns exemplos de metais e ligas utilizadas como biomateriais são: titânio, liga de titânio-alumínio-vanádio e as ligas de cromo-cobalto (62, 63). No entanto, a principal desvantagem do uso de biomateriais metálicos é a liberação de íons, que pode acontecer por dissolução, desgaste ou corrosão do metal quando em contato com os tecidos e fluidos do organismo (64-66). Esta liberação pode causar citotoxicidade, alergia, metaloses, reações inflamatórias e encapsulação fibrótica (67-70).

Os biomateriais cerâmicos têm como principal vantagem a biocompatibilidade a qual está diretamente relacionada à sua composição química, que contêm íons geralmente encontrados fisiologicamente em nosso organismo, como por exemplo, Ca^{2+} , K^+ , Mg^+ , Na^+ (62). Os materiais cerâmicos são muito estáveis quimicamente, e por isso praticamente não reativos. Em termos físico-químicos, são considerados frágeis, duros, resistentes a ataques ácidos, estáveis a altas temperaturas e isolantes térmicos e elétricos (71). Em função destas propriedades físico-químicas podem ser divididos em três grupos: os materiais cerâmicos oxidados, os materiais cerâmicos do tipo fosfato de cálcio e os vidros (de sílica e cerâmicos) (72).

Os materiais cerâmicos oxidados, quando implantados nos tecidos orgânicos, se mantêm estáveis e inertes quimicamente. Alguns exemplos deles são os óxidos de alumina, de zircônia e de magnésio (71).

Os materiais cerâmicos do tipo fosfato de cálcio possuem comportamento biológico diferente, e são muito utilizados para preenchimento de defeitos ósseos (73, 74) e revestimentos de implantes metálicos (75-78). Devido à sua

semelhança de composição com a fase mineral dos tecidos duros do organismo humano (ossos e dentes), apresentam boa biocompatibilidade (79). Alguns exemplos de materiais cerâmicos deste grupo são os fosfatos tricálcicos e as apatitas.

No terceiro grupo estão os vidros de sílica e os vidros cerâmicos. Os vidros de sílica apresentam boas propriedades de adesão ao osso e biocompatibilidade, porém possuem limitações quanto a resistência mecânica. A fim de melhorar as propriedades mecânicas foram realizadas modificações no processo de síntese dos vidros de sílica, dando origem aos vidros cerâmicos (71). Os vidros têm sido utilizados no preenchimento de defeitos ósseos (80-82), na prevenção da reabsorção alveolar pós exodontia (83), no revestimento de implantes metálicos para melhorar suas propriedades mecânicas e na regeneração óssea (84).

Os polímeros são caracterizados por cadeias extensas de unidades monoméricas repetidas, unidas por ligações covalentes, com peso molecular elevado. Os monômeros são constituídos de ligações químicas do tipo C-C, podendo conter átomos de C, N, O, S e Si. O comportamento físico-químico dos polímeros está diretamente relacionado com a composição química, estrutura, extensão da cadeia macromolecular (peso molecular) e distribuição das cadeias (85). Alguns exemplos de polímeros utilizados como biomateriais são polietilenos, polipropilenos, poliuretano, ácido polilactídico (PLA) e o polimetacrilato de metila (PMMA). O uso de alguns polímeros como biomateriais pode ter como desvantagem a possibilidade de sensibilização alérgica e respostas patológicas devido à liberação de monômeros tóxicos. Além disso, os biomateriais poliméricos trazem como desvantagem a baixa resistência mecânica. Já a principal vantagem é a possibilidade de serem gradualmente substituídos pelo tecido do hospedeiro, quando implantados, evitando uma segunda intervenção cirúrgica para remoção do implante (71).

Os biomateriais compósitos ou híbridos são aqueles obtidos através da combinação dos diferentes tipos de materiais citados anteriormente. As associações têm como principal finalidade tentar superar as limitações individuais apresentadas pelos componentes quando utilizados isoladamente e assim, potencializar as suas propriedades mecânicas e físico-químicas individuais, a fim de melhorar o seu comportamento biológico. Assim, os

compósitos são sintetizados para se obter propriedades que os componentes isolados não possuem e de forma superior às que adviriam da simples adição das propriedades de cada um deles. O tecido ósseo é um exemplo de compósito criado pela natureza, em que a combinação das fibras colágenas com os diferentes minerais deu origem a um tecido cujas propriedades biomecânicas são excelentes (85-89).

2.1.1.2 classificação quanto ao comportamento biológico

De acordo com a resposta biológica gerada nos tecidos quando colocados em contato com os biomateriais, podemos classificar os biomateriais em: bioinertes, biotolerantes e bioativos.

Os materiais bioinertes são aqueles menos susceptíveis a causar uma resposta biológica adversa devido à sua estabilidade química. A liberação de componentes é quase que inexistente e por isso, caracterizam-se por não provocarem reação de corpo estranho no organismo onde são implantados. A formação de cápsula ou tecido fibroso na interface entre os tecidos envolventes é praticamente inexistente. Alguns exemplos de biomateriais considerados bioinertes são a alumina e zircônia (90-92).

Os materiais biotoleráveis são aqueles apenas tolerados pelo organismo, ou seja, moderadamente aceitos pelos tecidos envolventes, e, portanto, isolados dos tecidos adjacentes através da formação de uma camada de tecido fibroso. Esta camada é induzida por meio da liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão, entre outros, por parte do material implantado. A espessura da camada é inversamente proporcional à tolerabilidade dos tecidos ao material. A utilização deste tipo de biomaterial implica na presença de tecido conjuntivo fibroso entre o biomaterial implantado e o tecido. Alguns exemplos são aço inoxidável, ligas de cromo-cobalto e PMMA (92).

Os materiais são considerados bioativos quando há a formação de uma união direta e resistente entre a superfície do material e os tecidos onde este é

implantado, sem que haja a presença de invólucros fibrosos. Essa união ocorre devido à similaridade entre o biomaterial e o tecido. Esses tipos de materiais condicionam ou induzem atividade biológica onde são aplicados, através de uma série de reações bioquímicas na interface implante/tecido (59, 90). Os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os vidros bioativos são alguns exemplos (92).

2.2 Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio representam uma família de materiais cerâmicos, composta por uma vasta gama de elementos, caracterizados de acordo com alguns parâmetros como a razão entre a quantidade de cálcio e fosfato presente na composição (razão Ca/P), basicidade/acidez e solubilidade, sendo que um parâmetro sofre a influência do outro e os dois últimos estão diretamente relacionados com o pH da solução (93-95).

Os fosfatos de cálcio apresentam excelente biocompatibilidade e são bem aceitos e bem integrados pelo corpo humano quando implantados. Porém esta biocompatibilidade está diretamente relacionada com suas características físico-químicas como solubilidade, composição, tamanho de cristal e cristalinidade (95). A diminuição no tamanho do cristalito leva a um aumento da área superficial do material e assim aumenta o contato deste com os fluidos corpóreos. A cristalinidade está diretamente relacionada com o tamanho e morfologia do cristal. A diminuição da cristalinidade aumenta a solubilidade do material devido à redução do tamanho dos cristalitos e/ou aumento na distorção do cristal (95).

No nosso organismo ocorre a mineralização biológica, ou biomineralização, que é um processo de formação *in vivo* de minerais inorgânicos. Durante este processo, estruturas orgânicas regulam a nucleação, o crescimento, a morfologia e montagem dos cristais inorgânicos. A apatita biológica é sempre nanodimensional e nanocristalina. Assim, formas nanodimensionais e nanocristalinas de fosfatos de cálcio podem mimetizar tanto a composição

quanto as dimensões dos componentes constituintes dos tecidos duros calcificados presentes no nosso organismo, apresentando excelente biocompatibilidade (95, 96).

A partir do parâmetro de razão Ca/P é possível sugerir a fase de fosfato presente num determinado material, assim como sua solubilidade (93). A taxa de solubilidade dos fosfatos de cálcio é um parâmetro importante para seu comportamento *in vivo*, já que a biocompatibilidade é dependente, em grande parte, de sua solubilidade (97). Quanto menor a razão Ca/P, que pode variar de 0,5 a 2,0, maior a acidez e solubilidade do fosfato de cálcio(98). No Quadro 2.1 estão listados alguns dos fosfatos de cálcio mais comuns e as respectivas razões Ca/P.

Quadro 2.1- Tipos de fosfatos de cálcio e suas principais características (98)

Razão Ca/P	Fosfatos de Cálcio	Fórmula Química	Solubilidade a 25°C, g/L	Intervalo de pH de estabilidade em solução aquosa a 25°C
0,5	Fosfato monocalcico monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	~18	0,0 - 2,0
0,5	Fosfato monocalcico anidro	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	~17	(c)
1,0	Fosfato dicalcico diidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	~0,088	2,0 – 6,0
1,0	Fosfato dicalcico anidro	CaHPO_4	~0,048	(c)
1,33	Fosfato octacalcico	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	~0,0081	5,5 – 7,0
1,5	α - Fosfato tricalcico	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0025	(a)
1,5	β -Fosfato tricalcico	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0005	(a)
1,2 - 2,2	Fosfato de cálcio amorfo	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n=3-4,5$; 15-20% H_2O	(b)	~5 – 12(d)
1,5 – 1,67	Hidroxiapatita deficiente em cálcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	~0,0094	6,5 – 9,5
1,67	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	~0,0003	9,5 – 12
1,67	Fluorapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	~0,0002	7 – 12
2,0	Fosfato tetracalcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2^0$	~0,0007	(a)

- (a) Esses compostos não podem ser precipitados a partir de uma solução aquosa.
 (b) Não pode ser medido precisamente.
 (c) Estável a temperaturas acima de 100°C.
 (d) Sempre metaestável.

O meio e as condições em que as cerâmicas à base de fosfato de cálcio são sintetizadas possuem alto grau de influência nas suas características físicas (área de superfície e tamanho dos cristais) e químicas (composição). O tipo de fase de fosfato de cálcio formado irá depender das condições do meio utilizado durante a síntese, tais como: temperatura, pH, concentração dos íons, razão molar Ca/P, dentre outras (99, 100).

O ácido fosfórico é um ácido triprótico ou trivalente que pode doar três prótons para o meio. Estes hidrogênios ácidos podem ser convertidos por substituição gradual a fosfatos primários. Devido ao equilíbrio triprótico do ácido

fosfórico, as variações do pH alteram as concentrações relativas das quatro espécies de fosfatos possíveis provenientes da dissociação do ácido fosfórico (Figura 2.1), influenciando tanto na composição química quanto na razão Ca/P causada pela precipitação direta de fosfato de cálcio. Este equilíbrio permite o controle e a previsão para a formação dos diferentes fosfatos de cálcio num determinado meio (100).

Figura 2.1- Equilíbrio triprótico do ácido fosfórico. Concentrações das espécies de fosfatos formadas a partir da dissociação do ácido fosfórico, de acordo com as variações de pH (101)

Observando a Figura 2.1, podemos notar que em um pH fisiológico de aproximadamente 7,4, as espécies $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} são as predominantes.

Os primeiros estudos utilizando fosfatos de cálcio como biomateriais foram realizados em 1920 por Albee, no qual o fosfato tricálcico quando injetado para regenerar um defeito ósseo, em coelhos, demonstrou crescimento ósseo mais rápido do que nos defeitos não tratados (102). Mais de 50 anos depois, em 1975, Nery et al. utilizou o termo fosfato de cálcio bifásico, para descrever uma biocerâmica, constituída de 20% de hidroxiapatita e 80% de β - fosfato tricálcico e, pela primeira vez, foi publicada uma aplicação odontológica de um fosfato de cálcio no tratamento de doenças periodontais criadas cirurgicamente (103-105).

O crescente uso das biocerâmicas à base de sais de fosfato de cálcio se deve principalmente ao seu alto grau de biocompatibilidade, que provavelmente está associado à sua natureza química. Formados basicamente por íons cálcio e fosfato, os quais são componentes de tecidos como os ossos e dentes e, por isso, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica (106). Entre as cerâmicas com melhor desempenho estão o β -Fosfato tricálcico e a hidroxiapatita.

2.3 Apatitas

Dentro do grupo dos fosfatos de cálcio estão as apatitas. Apatita é o nome que se dá a um grupo de diversos minerais com propriedades isomorfas, ou seja, similares na estrutura cristalina, mas não necessariamente na composição (98). Devido a isso apatita é uma definição relacionada à estrutura química e não à composição. O nome apatita vem do grego “apatites” que significa “enganadora” e estes minerais são assim denominados, pois a falta de estequiometria e a similaridade de suas estruturas cristalinas dificultam a sua identificação (93, 107).

A apatita pode ter origem de minerais constituintes de rochas ígneas (principalmente as pegmatitas) e em rochas metamórficas, especialmente em calcários cristalinos, esqueletos de algumas espécies marinhas ou por precipitação direta da água do mar, através do carbonato de cálcio e fosfato de cálcio (108).

A sua fórmula geral é $A_{10}(BO_4)_6X_2$, onde A são geralmente cátions metálicos divalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} ou Cd^{2+}), BO_4 ânions trivalentes (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} ou MnO_4^{3-}), onde B geralmente são metalóides, e X halogenetos e ânions monovalentes (F^- , Cl^- , OH^- ou Br^-). E quando no lugar de X_2 há a presença do ânion bivalente CO_3^{2-} , temos as carbonatoapatitas (109). Cristalograficamente, todas as apatitas adotam simetria hexagonal ou pseudo-

hexagonal, sendo o grupo espacial mais comum o $P6_3/m$ (será explicado mais detalhadamente no item 2.4.2) (110).

A estrutura em rede das apatitas e seus vários sítios cristalográficos as tornam tolerantes às substituições, possibilitando a acomodação de elementos de cargas iônicas diferentes e substituições de elementos já presentes na sua composição (110, 111). No entanto, essas substituições afetam a cristalografia (tamanho do cristal e os parâmetros de rede) e as propriedades físico-químicas (solubilidade), e consequentemente a biocompatibilidade. A solubilidade das apatitas é um fator importante para saber o seu comportamento *in vivo*. Fatores como morfologia, tamanho do cristal e cristalinidade influenciam na sua dissolução (111-113).

Além disso, a habilidade em aceitar grande quantidade de cátions resulta em três aspectos cristaló-químicos peculiares à estrutura da apatita. Primeiro, existem dois sítios (A) cristalográficos distintos, sítio A(1) e A(2). A coordenação do ânion do sítio A(1) é metaprismática que é intermediária entre a coordenação octaedro perfeito e o prisma trigonal. A coordenação do ânion do sítio mais extenso A(2) é irregular com a ligação entre sete e nove oxigênios. Estas coordenações mal definidas aumentam a capacidade de imobilizar cátions de diferentes tamanhos. O sítio A(2) situa-se adjacente a um “túnel” contínuo dentro da estrutura e é parcialmente preenchido com ânions X e fornece uma localização para pares isolados de elétrons. Uma segunda causa de flexibilidade estrutural é devido ao fato de os tetraedros BO_4 serem os únicos poliedros rígidos. Rearranjos mínimos na topologia destas unidades estruturais podem adaptar as dimensões da apatita para acomodar cátions de raios iônicos bastante distintos. Como terceiro aspecto, as apatitas podem exibir o sítio X não estequiométrico, facilitando o equilíbrio de carga, caso o ambiente químico seja complexo (110).

A ocupação do sítio aniônico monovalente dá a denominação da apatita. A sua fórmula é $Ca_{10}(PO_4)_6X_2$ onde X pode ser o flúor no caso da fluorapatita, cloro no caso da cloroapatita e hidroxila (OH) no caso da hidroxiapatita (93, 95).

As apatitas biológicas diferem das sintéticas na estequiometria. As puras ou estequiométricas não estão presentes nos sistemas biológicos. Apatitas da família dos fosfatos de cálcio são consideradas cálcio deficientes quando a razão Ca/P é menor que 1,67, sendo este o valor estequiométrico da

hidroxiapatita pura (apatita sintética). As apatitas biológicas são não-estequiométricas, pois apresentam íons substituintes em sua estrutura, provocando modificações importantes na sua composição, morfologia e propriedades cristalinas, sendo que a razão Ca/P é de 1,63 para esmalte, 1,61 para dentina e 1,71 para o osso. As apatitas obtidas por síntese aquosa geralmente consistem inicialmente de uma camada estrutural hidratada contendo espécies iônicas facilmente substituíveis, com baixa cristalinidade e estequiometria não totalmente definida (114-116).

2.4 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é um biomaterial do grupo das cerâmicas bioativas, pertencente à família dos fosfatos de cálcio, mais especificamente do grupo das apatitas. Ela é o componente inorgânico majoritário da fase mineral de ossos e dentes, compondo cerca de 95% desses tecidos (3, 95, 117). Biologicamente, a hidroxiapatita pode ser encontrada na composição das fases minerais dos tecidos calcificados (esmalte, dentina e osso) (90, 93), assim como em calcificações patológicas (cálculo dentário humano, cálculos de glândulas salivares e renais).

Atualmente existe um grande interesse em sintetizar hidroxiapatita, pois a hidroxiapatita sintética apresenta grande similaridade química com a matriz inorgânica dos tecidos mineralizados, tornando-a um dos materiais mais biocompatíveis (118). A hidroxiapatita é considerada capaz de induzir o crescimento de tecido ósseo na região em que se encontra (osteocondução), graças a sua estrutura porosa que se assemelha ao osso poroso (119). Além disso, a superfície da hidroxiapatita permite interações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidas na sua superfície, estabelecendo uma forte ligação com o tecido sobre a qual é aplicada (bioatividade) e induzindo a regeneração tecidual (120). Como as células do organismo são incapazes de distinguir a hidroxiapatita da superfície óssea,

proliferações de osteoblastos, fibroblastos e outras células ósseas são permitidas (121, 122). Todas estas propriedades como biocompatibilidade, osteointegração, osteocondução, capacidade de regeneração óssea e de adsorção de moléculas, fazem com que este biomaterial seja considerado um dos mais importantes substitutos do osso humano em implantes e próteses (123, 124). Todas estas características da hidroxiapatita estão relacionadas à sua grande similaridade com a fase cristalina dos tecidos ósseos.

No entanto, existem diferenças entre a hidroxiapatita biológica e a sintética, em relação à estequiometria, composição e cristalinidade, influenciando as propriedades físicas e mecânicas. As apatitas biológicas encontradas em tecidos mineralizados como esmalte, dentina e osso apresentam substituições iônicas em sua estrutura. Geralmente são carbonatadas e deficientes em cálcio, apresentando ausência de estequiometria e uma cristalinidade menor (125). A presença de CO_3^{2-} na estrutura da hidroxiapatita denominada de carbonatada é um fator de importância primordial, pois é a principal causa de distorção da rede cristalina, influenciando na solubilidade (126). A maior quantidade de carbonato diminui o tamanho do cristal, aumentando sua área superficial e contribuindo para o aumento da solubilidade das hidroxiapatitas carbonatadas. Além disso, a ligação Ca-CO_3 é mais fraca que a Ca-PO_4 , tornando a hidroxiapatita carbonatada mais susceptível à dissolução ácida (95).

As apatitas do esmalte dos dentes diferem das apatitas encontradas em dentina e osso, pois apresentam menor cristalinidade e presença de elementos minoritários (principalmente CO_3^{2-} e Mg^{2+}). Além disso, a apatita do esmalte dentário é a que possui a menor solubilidade e maior tamanho dos cristais (125).

Algumas espécies de peixe, como o tubarão apresentam esmalte composto de apatitas com substituições do elemento OH^- por F^- conferindo-lhe maior resistência às lesões cáries quando comparadas com esmalte de dentes humanos (127, 128).

As principais aplicações da hidroxiapatita em medicina e odontologia são: reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas, aumento do rebordo alveolar, osteointegração de implantes metálicos, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução buco-maxilo facial, reparo e substituição de paredes orbitais, recobrimento de implantes metálicos, dentifrícios, entre outros (117).

Apesar do significativo papel biológico exercido pela hidroxiapatita como principal constituinte inorgânico de ossos e dentes, o uso desta não se restringe apenas a aplicação na área médica como material biocompatível. Além disso, a hidroxiapatita pode ser utilizada como trocador iônico, liberador controlado de drogas, catalisador e também na área ambiental como antipoluinte, absorvendo metais pesados e/ou rejeitos industriais em solos e águas poluídas (93, 129, 130). Na catálise, a hidroxiapatita tem sido usada em reações de desidratação e desidrogenação de álcoois e oxidação do metano (93, 130). Na área farmacêutica pode ser utilizada como separador de proteínas em coluna cromatográfica (131).

Tanto as atuais como as potenciais aplicações da hidroxiapatita estão relacionadas à sua estrutura superficial característica, que permite substituições iônicas com grande facilidade (129). A hidroxiapatita forma facilmente soluções sólidas via reações químicas com vários tipos de óxidos metálicos, haletos e carbonatos. Além disso, os cátions Ca^{2+} podem sofrer substituições em relativa extensão por cátions monovalentes (Na^+ e K^+), bivalentes (Sr^{2+} , Ba^{2+} e Pr^{2+}) e trivalentes (Y^{3+}). Já o OH^- pode ser substituído por halogenetos ou íons carbonatos (95).

2.4.1 Características químicas da hidroxiapatita

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio hidratado do grupo mineral das apatitas. A hidroxiapatita estequiométrica (pura) possui a seguinte fórmula química:

com as seguintes porcentagens em peso: 39,9% Ca, 18,5% P e 3,38% OH, com uma razão $\text{Ca/P}=1,67$.

Entretanto estas hidroxiapatitas puras ou estequiométricas não estão presentes em sistemas biológicos. As hidroxiapatitas biológicas têm sido

descritas como apatitas deficientes de cálcio, não estequiométricas, impuras, ou em alguns casos, como no esmalte dentário, hidroxiapatitas carbonatadas (132).

Na sua forma natural, ou seja, quando encontrada na natureza, a hidroxiapatita é precariamente cristalina, os cristais têm formas de agulhas, bastonetes ou placas medindo aproximadamente de 30 Å a 50 Å de largura e até 600 Å de comprimento (133).

2.4.2 Estrutura e características cristalográficas da hidroxiapatita

Em 1926, estudos de difração de raios x e análise química identificaram a hidroxiapatita como o principal composto da fase mineral de tecidos mineralizados como osso, esmalte e dentina (134). No entanto, somente depois de trinta anos, que a estrutura da hidroxiapatita foi primeiramente descrita (135). A partir de um mineral, Beevers et. al mostraram as posições atômicas do cristal. Mais tarde, a partir de uma hidroxiapatita sintética, Kay et al. complementaram os achados (136).

O termo estrutura cristalina refere-se a um conjunto de átomos (pontos) periodicamente distribuídos no espaço, formando uma rede. A rede possui uma estrutura tridimensional onde acontece a repetição, nas 3 direções, de uma unidade estrutural básica denominada célula unitária. Esta unidade é representada por um paralelepípedo constituído por diversos nós. Cada nó se movimenta segundo 3 eixos a, b e c, sendo, α , β e γ os ângulos entre os eixos. A célula unitária é definida segundo estes 6 parâmetros: 3 axiais (a, b e c) e 3 angulares (137) (Figura 2.2).

Figura 2.2- Esquema mostrando a célula unitária de uma rede cristalina, seus parâmetros de distinção e a rede cristalina ao lado com a repetição das células unitárias (137)

Existem 7 tipos de células unitárias com parâmetros diferentes, correspondendo aos 7 sistemas cristalinos. As redes descritas por estes sistemas podem ser primitivas (quando todos os pontos reticulares estão localizados no vértice do paralelepípedo que constitui a célula) ou não primitivas. As redes podem ser classificadas em P, R, F, I e C, sendo P e R primitivas e F, I e C não primitivas:

P — célula unitária primitiva, ou simples, onde todos os pontos reticulares estão localizados nos vértices do paralelepípedo que constitui a célula;

R — célula unitária primitiva com eixos iguais e ângulos iguais, ou hexagonal, tendo, para além dos pontos que determinam os vértices, pontos duplamente centrados no corpo

F — célula unitária centrada nas faces ou face centrada, apresentando além dos pontos localizados nos vértices, um ponto adicional no centro de cada face da célula.

I — célula unitária centrada no corpo ou de corpo centrado, tendo, para além dos pontos que determinam os vértices, um ponto reticular no centro da célula.

C — centrada em uma única face (A, B ou C), um ponto adicional no centro de um tipo de face

A combinação dos 7 tipos de sistemas cristalinos com os tipos de rede dão origem aos 14 tipos de Redes de Bravais (138)(Quadro 2.1).

Quadro 2.1-Os sete sistemas cristalinos, com seus respectivos parâmetros de rede e tipos de Rede de Bravais

Sistemas cristalinos	Parâmetros Angulares	Parâmetros de Aresta	Rede de Bravais
Triclínico	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq$	$a \neq b \neq c$	P
Monoclínico	$\alpha = \beta = 90^\circ ; \gamma > 90^\circ$	$a \neq b \neq c$	P, C
Ortorrômbico	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$a \neq b \neq c$	P, C, I, F
Tetragonal	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$a = b \neq c$ ($a_1=a_2 \neq c$)	P, I
Trigonal	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	$a = b = c$	P (R)
Hexagonal	$\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	$a = b \neq c$ ($a_1=a_2=a_3 \neq c$)	P
Cúbico	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$a = b = c$	P, I, F

A simetria de um cristal é uma propriedade importante na sua descrição. Um dos elementos que descreve a simetria de um cristal é seu eixo de rotação. Nas redes cristalinas tridimensionais podem existir eixos de rotação binários (2), ternários (3), quaternários (4) e senários (6). Outra operação de simetria possível nas redes cristalinas é a reflexão num plano de modo especular que, quando ocorre é representado pela letra *m*. Através da combinação da reflexão em um plano de simetria com um deslizamento associado a uma dada translação obtêm-se a operação de simetria denominada deslizamento e representada pelas letras a, b e c. Em cristalografia, o grupo espacial de um cristal descreve como ocorre a simetria deste. Existem 230 tipos de grupos espaciais. O tipo de simbologia mais utilizado para descrever o grupo espacial de um cristal é o de Hermann-Mauguin, no qual o símbolo é composto de 4 elementos: o primeiro descreve o tipo de Rede de Bravais (P, R, F, I ou C) e os outros três, os tipos de elementos de operação de simetria presentes (138).

A hidroxiapatita, quando pura e estequiométrica, apresenta uma estrutura monoclinica com o espaçamento do grupo espacial $P2_1/b$ (onde P indica que a rede de Bravais é primitiva, 2 significa eixo rotacional de ordem 2 ($360/2 = 180$ graus, portanto rotação de 180 graus), 1 subscrito significa deslocamento de $1/2$, ou seja, deslocamento de meia célula unitária, também chamado de operação eixo parafuso, e /b significa plano de deslizamento na direção do vetor b). No

entanto, quando aquecidas a temperaturas acima de 250°C, acontece a transição alotrópica da forma monoclinica para hexagonal (117, 139). Além disso, o aumento da temperatura, faz com que haja uma maior difusão de substâncias dentro da amostra, permitindo que o material amorfo existente no meio possa aderir aos cristais, provocando o crescimento deste e aumentando assim a sua cristalinidade (140).

Algumas impurezas, ou substituições parciais da hidroxila por íons cloreto ou fluoreto, estabilizam a forma hexagonal a temperatura ambiente. Por esse motivo, a hidroxiapatita estequiométrica não ocorre em sistemas biológicos, sendo sempre encontrada na conformação hexagonal (141). A hidroxiapatita encontrada na natureza pode conter pequena quantidade, cerca de 3% em massa, de íons trivalentes (íons terras raras), exercendo efeito estabilizador (142).

Quando a hidroxiapatita apresenta estrutura pertencente ao sistema hexagonal, o grupo espacial é $P6_3/m$, onde P indica que a rede de Bravais é primitiva, 6 significa eixo principal rotacional de ordem 6 ($360/6 = 60$ graus, portanto rotação de 60 graus), 3 subscrito significa deslocamento de $3/6 (=1/2)$ na direção do eixo principal que é de ordem 6, ou seja, deslocamento de meia célula unitária, também chamado de operação eixo parafuso, e /m significa plano perpendicular, portanto, perpendicular ao eixo principal de ordem 6. As dimensões de sua célula cristalina são de $a=b=0,9423$ e $c=0,6875$ nm (valores válidos para hidroxiapatita pura preparada por reação de estado sólido ou precipitação e sinterização a 1100°C). Na Figura 2.3 podemos observar uma representação da estrutura cristalina da hidroxiapatita (95, 143).

Figura 2.3- Estrutura cristalina da hidroxiapatita (117)

A sua célula unitária consiste em grupos PO_4 , Ca e OH, empacotados juntos em um arranjo como visto na Figura 2.4.

A célula unitária hexagonal da hidroxiapatita contém 10 íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio 1, tetraédricos (denominado Ca1) e seis no sítio 2, octaédricos (Ca2). Os íons cálcio no sítio 1 estão alinhados em colunas, enquanto no sítio 2 estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura. Os cátions do sítio Ca1 estão coordenados a 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4 e também a 3 outros átomos de oxigênio distantes. A existência de dois sítios de cálcio traz consequências importantes para as hidroxiapatitas que contém impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza (144-146).

Figura 2.4- Representação gráfica da célula unitária da hidroxiapatita (93)

Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino c . Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons O^{2-} e Ca^{2+} estão ligadas entre si por íons fosfato. Os átomos de oxigênio dos íons hidroxila estão situados a $0,9 \text{ \AA}$ abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação $O-H$ forma um ângulo de aproximadamente 30° com a direção c . Dos quatro átomos de oxigênio que constituem o grupo fosfato, dois estão situados em planos perpendiculares à direção c e os outros dois paralelos a esta direção (90, 93, 95, 147).

A estrutura da hidroxiapatita tem sido muito estudada, porém, a ocupação dos locais e configuração dos íons OH^- ainda não se encontra bem estabelecida. E este obstáculo deve-se à dificuldade na obtenção de monocristais para análise por difração de raios X (148).

Através da análise por difração de raio-x é possível identificar a cristalinidade e a estrutura de rede do cristal. Na Figura 2.5 podemos observar os padrões de difração de diversos tipos de apatita.

Figura 2.5- Padrão de difração de diversas apatitas (117)

2.4.3 Não estequiometria da hidroxiapatita

Uma das características da hidroxiapatita é a sua multiplicidade de composições não estequiométricas. A hidroxiapatita estequiométrica possui razão Ca/P=1,67 e um teor de água =1,79 em peso.

A fórmula genérica utilizada para a hidroxiapatita não estequiométrica está representada abaixo:

Nesta fórmula é levada em consideração uma deficiência em cálcio (149), sendo o balanço total de carga compensado pela introdução de íons H^+ e a formação de moléculas de água. Além disso, leva-se em consideração também que outras espécies iônicas como H_3O^+ , HPO_4^- , HPO_4^{2-} possam ser incorporadas durante o processo de síntese por via úmida, além dos íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- . Assume-se ainda a possibilidade de substituição de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} por íons H_3O^+ , HPO_4^- e HPO_4^{2-} , respectivamente, na rede cristalina da hidroxiapatita (150).

Esta multiplicidade de composições não estequiométricas está diretamente relacionada com a capacidade de a estrutura da hidroxiapatita permitir substituições catiônicas e aniônicas com facilidade, característica esta comum a todos os minerais pertencentes a família das apatitas (151). Cada elemento membro da hidroxiapatita pode fazer uma série de substituições isomórficas catiônicas ou aniônicas, levando à formação de correspondentes isomórficos. As substituições podem ser iso iônicas ou hetero iônicas (112).

Geralmente, as substituições na estrutura da hidroxiapatita ocorrem nos grupos (OH), (Ca) ou (PO_4) e resultam em alterações nos parâmetros de rede e em algumas propriedades como solubilidade e morfologia, no entanto, sem alteração significativa na simetria hexagonal. Por exemplo, na substituição do grupo OH pelo flúor, no caso da fluorapatita, há diminuição na solubilidade, porém sem alteração da simetria hexagonal. Já, no caso das cloroapatitas,

ocorre a perda da simetria hexagonal, exibindo esta, uma simetria monoclinica (112).

Essas substituições, portanto, podem alterar a cristalinidade, parâmetros de rede, dimensões dos cristais, textura superficial, estabilidade, bioatividade, biocompatibilidade, propriedades de adsorção e solubilidade da estrutura da hidroxiapatita, sem que necessariamente ocorra significativa mudança na simetria hexagonal da estrutura do cristal (90, 144).

De acordo com Souza, em 2010, diferentes fases de fosfatos de cálcio podem ser estabilizadas ou desestabilizadas pela presença de cátions e ânions, sendo ou não incorporados de forma significativa à estrutura cristalina e, dessa forma, influenciando nos processos de nucleação e crescimento subsequente do cristal. Dentre as numerosas possibilidades de substituições iônicas que a estrutura de hidroxiapatita pode sofrer, as que apresentam extrema importância são as substituições dos grupos aniônicos da hidroxiapatita pelo íon carbonato (CO_3^{2-}) (152).

O carbonato pode fazer substituições tanto no grupo OH quanto no grupo fosfato (PO_4), denominadas como substituições do tipo A e B, respectivamente. Estas duas possibilidades de substituições possuem efeitos opostos nos parâmetros de rede (eixos a e c). A substituição do tipo A causa uma expansão do eixo a e uma contração no eixo c, enquanto a substituição do tipo B causa uma contração do eixo a e uma expansão do eixo c (125).

A presença de íons carbonato na estrutura da hidroxiapatita provoca um aumento da solubilidade dos cristais de apatita e alteram a cristalinidade da estrutura e tamanho do cristal. A formação de cristais de menor tamanho provoca aumento na área superficial destes e consequente aumento na taxa de dissolução e alargamento dos picos de difração (90, 95).

O Ca^{2+} também sofre substituições, geralmente por metais como Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} e Co^{2+} e este tipo de substituição é conhecido como isovalente, já que a carga é idêntica (146). Mas também é possível ocorrer substituições heterovalentes quando, por exemplo, o elemento Ca^{2+} é substituído pela combinação $\text{M}^+ + \text{M}^{3+}$ (153).

Os grupos hidroxila são substituídos geralmente por halogenetos como fluoreto, cloreto e brometo. Estas substituições podem alterar parâmetros de

rede, cristalinidade, estabilidade de estrutura, dimensões e textura superficial dos cristais (146).

Já o grupo PO_4 além de ser substituído por carbonato pode também sofrer substituições pelo tetraedro contendo vanádio, levando à formação de vanadatoapatita e também à formação de soluções sólidas de substituição (154).

2.4.4 Solubilidade da hidroxiapatita

A hidroxiapatita é solúvel em soluções ácidas, mas, sempre se apresenta insolúvel em soluções alcalinas e fracamente solúvel em água destilada. No entanto, é possível aumentar a solubilidade da hidroxiapatita em água destilada através da adição de eletrólitos. Além disso, a solubilidade pode ser modificada pela presença de aminoácidos, proteínas, enzimas e outros compostos orgânicos. No entanto, a taxa de solubilidade depende diretamente da forma, porosidade, tamanho do cristal, cristalinidade, presença de defeitos, etc. A solubilidade da hidroxiapatita não cristalina e deficiente de cálcio, por exemplo, é menor quando comparada à hidroxiapatita pura e estequiométrica. Por isso, através dos diferentes métodos de síntese de hidroxiapatita, pode-se obter um mineral desde o praticamente absorvível até o não absorvível em meios fisiológicos (117).

2.5 Hidroxiapatita nanoparticulada

O prefixo "nano" significa anão em grego. Na linguagem científica, usamos este prefixo para uma unidade equivalente a uma medida de 10^{-9} unidades de metro (155). Por isso, quando falamos de materiais nanoestruturados estamos nos referindo a materiais com dimensões extremamente pequenas.

A nanociência pode ser considerada como área do conhecimento que estuda sistemas com estruturas que exibem propriedades físicas, químicas e biológicas novas ou alteradas devido a diminuição de seu tamanho à ordem de nanômetros, em pelo menos uma de suas dimensões (156) (157).

Segundo o SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) de 2007, define-se nanomaterial ou nanoestrutura ou nanopartícula como qualquer estrutura que apresente pelo menos uma dimensão na ordem de 100nm ou menos, seja no comprimento, largura ou espessura (155, 157, 158). Esta definição é importante uma vez que “nano” não significa apenas menor que “micro”. Quando o termo é utilizado corretamente, nanotecnologia está relacionada apenas dentro desta escala de dimensão, e isto é extremamente relevante do ponto de vista biológico e dos fenômenos relacionados aos biomateriais em nanotecnologia (158).

Nanotecnologia pode ser definida como a aplicação destas novas propriedades adquiridas pelas nanoestruturas nas mais diversas possibilidades de utilização (157).

Nas últimas décadas, tem sido observado um crescente número de pesquisas envolvendo materiais nanoestruturados. No entanto, a utilização destes materiais nanoestruturados não é tão recente. É possível identificar a presença da nanotecnologia em períodos remotos da história da humanidade. Há aproximadamente 4000 a.c. os alquimistas egípcios utilizavam partículas de ouro em suspensão com tamanho de 1-100nm para estimular a mente e restaurar a juventude e denominavam tais partículas como “elixir de ouro” ou “elixir da longa vida” (157). Embora sem saber, há milênios, os chineses já aplicavam a nanotecnologia ao utilizarem nanopartículas de carvão em solução aquosa para produzir tinta nanquim. Já na Europa, o colorido dos vitrais de igrejas medievais era resultado da formulação do vidro com nanopartículas de ouro. Os romanos também fazem parte deste grupo de pioneiros da nanotecnologia, o famoso Cálice de Licurgo do século IV d.c. exibia uma cor verde quando a luz era refletida e vermelha quando a luz era transmitida, graças à presença de nanopartículas de ouro e prata no vidro de sua composição, já que a luz ao bater no vidro faz os metais ali contidos vibrarem de maneira diferente dependendo da posição do observador (157, 159). Mas somente no século XIX Michael Faraday descobriu a relação entre as alterações nas

propriedades ópticas e o tamanho das partículas de ouro, observando que o tamanho das partículas influenciava na absorção de luz. Em sua forma natural o ouro exibe uma coloração amarela, porém, dependendo do tamanho das partículas, ele pode se mostrar negro, rubi ou arroxeadado. Assim, é possível obter materiais baseados em ouro em diferentes cores, dependendo do tamanho das partículas (159).

Apesar da nanotecnologia estar presente na natureza há milhares de anos, o surgimento da nanociência e nanotecnologia como uma atividade científica ocorreu somente na década de 50, quando o físico americano Richard Feynman, durante uma conferência da Reunião da Sociedade Americana de Física, sugeriu a construção e manipulação, átomo a átomo, de objetos na escala nanométrica. E apenas na década de 80, quando Kroto descobriu os fulerenos (160) e, posteriormente, Iijima, a síntese dos nanotubos de carbono (161), que os temas nanociência e nanotecnologia, antes vistos como ficção, passaram a ser tratados com maior seriedade pela comunidade científica.

As nanopartículas, devido ao seu tamanho, apresentam propriedades diferentes dos materiais usuais. A transição de micro para nano leva a inúmeras alterações nas propriedades eletrônicas, óticas e mecânicas do material, sem alterar a composição química (162, 163). Por exemplo, materiais semicondutores podem torna-se isolantes quando se apresentam em escala nanométrica (164). Esta aquisição de novas propriedades, é a principal motivação para o crescente aumento de estudos envolvendo o desenvolvimento e a utilização de materiais nanoestruturados, pois com novas propriedades surgem novas possibilidades de aplicações nas mais diversas áreas da ciência (162, 165). Assim, o enfoque das pesquisas em nanotecnologia tem sido controlar as propriedades dos materiais através de seu desenvolvimento dentro de uma escala de tamanho de 1 – 100nm (166). E quando usamos os termos “criar e controlar” estamos nos referindo à habilidade de trabalhar em nível atômico, molecular e macromolecular, objetivando a obtenção de materiais, dispositivos e sistemas cujas propriedades e aplicações são fundamentalmente novas e o produto final possui um melhor desempenho. Só é possível a fabricação de nanopartículas, nanocamadas, nanotubos e nanofios, devido à forma como estão organizados os átomos e moléculas (167).

Além de alterações nas propriedades físicas e químicas, uma consequência imediata à diminuição de tamanho é o grande aumento da área superficial (155). No caso das nanoesferas, quanto menor o diâmetro da partícula, maior é a quantidade de átomos na superfície, como mostra a Figura 2.6 (168).

Figura 2.6- Porcentagens de átomos na superfície de acordo com o diâmetro da partícula (adaptado de Ichinose et al., 1992)

Os cristais de hidroxiapatita presentes no corpo humano possuem tamanho tão pequeno que são considerados materiais nanoestruturados (169). Como os cristais de hidroxiapatita encontrados fisiologicamente nos tecidos duros são nanoscópicos, com formato de pratos ou bastões e com poucos nanômetros de espessura e dezenas de nanômetros de comprimento, acredita-se que a hidroxiapatita nanoparticulada, similar ao mineral natural, é a melhor opção para substituição óssea e regeneração (44, 170). Nas primeiras pesquisas realizadas com hidroxiapatita, a principal preocupação era com o controle da estequiometria da hidroxiapatita sintetizada. Entretanto, atualmente, com o

avanço da nanotecnologia, existe um considerável interesse para o controle não só da morfologia, mas também do tamanho (171).

Hidroxiapatita nanoparticulada é definida como hidroxiapatita com tamanho do cristal de 1 - 100nm. As nanopartículas de hidroxiapatita possuem propriedades mecânicas como dureza superior, quando comparadas às micropartículas (172). Além disso apresentam maior área superficial, pois os átomos presentes na camada mais superficial possuem ligações insaturadas, fazendo com que a nano-hidroxiapatita apresente alta reatividade (173, 174).

A hidroxiapatita já é considerada um ótimo biomaterial com excelentes propriedades, porém a literatura mostra que o tamanho da partícula influencia não só na formação dos tecidos duros como também nas propriedades intrínsecas do biomaterial como, por exemplo, na solubilidade e consequentemente, na biocompatibilidade (35, 36).

HA nanoparticulada sintética tem sido utilizada em aplicações médicas desde 1970 (37). Devido a sua biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, tem ganhado, cada vez mais, ampla aceitação tanto na medicina como na odontologia (38). A HA nanoparticulada tem sido muito indicada para reposição de tecido ósseo, preenchimento de defeitos ósseos, guia de regeneração ou como recobrimento de superfície de implantes metálicos para acelerar o processo de cicatrização (39-41). Alguns experimentos envolvendo proliferação celular têm demonstrado que nanopartículas esféricas de HA apresentam maior biocompatibilidade quando comparada à HA com formato irregular, disponível comercialmente (175).

Narayanan et al. demonstraram que a hidroxiapatita sintética tem sua osteocondutividade aprimorada se contiver cristais nanoestruturados (176). Além disso, os nanocristais de HA parecem aumentar as funções dos osteoblastos, diminuir a morte celular por apoptose, além de aumentar a proliferação e atividade de células ligadas ao crescimento ósseo (44, 177). Devido a sua maior área e rugosidade superficial, as nanopartículas de HA têm demonstrado melhor adesão celular e melhor interação celular com a matriz óssea (42, 44, 178).

Estudos têm demonstrado que biomateriais a base de HA nanoparticulada são mais facilmente biodegradados (42, 43) e possuem maior bioatividade (44, 45) quando comparados com as cerâmicas no tamanho “micro”.

Um estudo *in vitro* demonstrou que nanopartículas de HA com tamanho menor são capazes de simultaneamente reparar e prevenir lesões iniciais de erosão em esmalte comparadas com cristais de hidroxiapatita de maior tamanho (52).

A liberação de íons cálcio pela nanopartículas de HA é também similar à apatita biológica e, significativamente, mais rápida quando comparada aos cristais de maior tamanho (179).

Estudo utilizando dentifrícios que continham hidroxiapatita nanoparticulada mostrou maior efeito remineralizante em dentina bovina quando comparados a dentifrícios contendo fluoreto de amina (48). Outro estudo demonstrou redução do ritmo de progressão de lesão de cárie em esmalte quando aplicado dentifrício contendo 10% de hidroxiapatita (180). Suspensão contendo hidroxiapatita nanoparticulada a 10% mostrou ser capaz de remineralizar uma lesão de cárie inicial em esmalte de dente bovino (*in vitro*) (51).

Além disso, um outro estudo mostrou que nanopartículas de HA e sílica possuem a capacidade de infiltrar a matriz de colágeno da dentina desmineralizada, formando assim um arcabouço adequado para a remineralização, uma vez que as partículas infiltradas parecem agir como sementes entre a matriz de colágeno criando um ambiente apropriado para o crescimento mineral (55).

O tamanho, a morfologia e a estrutura das partículas de HA possuem um efeito significativo na resposta biológica, não apenas em termos de bioatividade, mas também na biocompatibilidade. Sendo assim, é de extrema importância o conhecimento do método de síntese e das características da partícula sintetizada antes de aplicá-las no organismo (181-187).

2.6 Rotas de síntese da hidroxiapatita

A hidroxiapatita pode ser obtida a partir de ossos e dentes humanos ou de outra espécie animal, por transformações de materiais naturais, como também nos esqueletos minerais dos corais e equinodermos, mas também pode ser sintetizada artificialmente (188).

Atualmente, um grande número de técnicas são desenvolvidas para a síntese do pó de hidroxiapatita devido ao número crescente de aplicações (189).

A hidroxiapatita pode se apresentar em diferentes formas, porosidades, tamanho de cristal, cristalinidade e defeitos cristalinos que interferem na solubilidade, capacidade de reabsorção deste material pelo organismo, alterando assim sua biocompatibilidade. O método de síntese adotado e o tratamento térmico posterior podem levar ao aparecimento ou não de outras fases de compostos de fosfato de cálcio, podendo comprometer algumas de características como a osteocondução, a integridade e eficiência mecânica em função da solubilidade. Portanto, as propriedades da hidroxiapatita são fortemente dependentes do método de síntese. A escolha e o controle da metodologia adotada no preparo da hidroxiapatita sintética depende da finalidade para a qual esta será utilizada, pois através de modificações no método de síntese, podem-se alterar características do produto final.

Grande parte dos condutores de prótons são instáveis a temperaturas maiores que 150°C e possuem baixa condutividade elétrica. Hidroxiapatitas deficientes em cálcio e com uma baixa relação Ca/P, apresentam propriedades elétricas e características estruturais que as tornam capazes de atuar como condutores de prótons e sensores de gás (129, 190).

Para aplicação clínica da hidroxiapatita como substituto ósseo, é necessário preparar pós de HA que apresentem boas propriedades mecânicas, pequeno tamanho de grão, área superficial aumentada e baixo grau de aglomeração de partículas (129).

A hidroxiapatita pode ser sintetizada a partir de reações em meios aquosos ou métodos de via úmida (síntese hidrotérmica, processo sol-gel, precipitação e neutralização) e não aquosos ou secos (reação em estado sólido e método

mecanoquímico) (90, 95). Dependendo da técnica escolhida e através de modificações nestes métodos “clássicos” de síntese pode-se alterar características morfológicas, estequiométricas, cristalinidade e relação Ca/P (131, 170, 191).

2.6.1 Reações em meios não aquosos ou métodos secos

Este tipo de método não utiliza solventes. De acordo com a literatura, as características do pó sintetizado por este método não são muito influenciadas pelos parâmetros utilizados durante o processo de síntese, por isso, os métodos secos não requerem controle preciso das condições, sendo este método apropriado para produção em massa de pó de cristais (192) porém com baixa reprodutibilidade.

2.6.1.1 reação em estado sólido

É um método considerado relativamente simples e de baixo custo, por isso muito utilizado para a produção de grandes quantidades de pó de HA (193-196).

É um método de interdifusão de íons a partir de partículas sólidas gerando um produto por um mecanismo baseado na difusão e nucleação. No caso dos fosfatos de cálcio, este processo exige temperaturas acima de 950°C para ocorrer a mistura mecanicamente homogênea dos compostos de cálcio e fosfato

(90, 197). Em um processo típico, os precursores são previamente moídos e então calcinados a uma temperatura muito alta (1000°C) (193). À temperatura elevada ocorre a mobilidade iônica proporcionando o processo de difusão sólido-sólido. Podem ser utilizados como precursores, elementos químicos de vários tipos que contenham Ca e fosfato ou então simplesmente um sal de CaP preparados previamente. A alta temperatura de calcinação leva a formação de uma estrutura bem cristalina, porém com baixa solubilidade. No entanto, o pó sintetizado por este método geralmente apresenta heterogeneidade na sua composição, podendo apresentar outras fases de compostos de fosfato de cálcio devido ao pequeno coeficiente de difusão dos íons no interior da fase sólida (194, 195).

Reações em fase sólida geralmente dão origem a produtos com alta cristalinidade, razão Ca/P variável, cristais com tamanho da ordem de micrômetros e morfologia variada (193-196, 198). A grande desvantagem é a necessidade de manutenção de temperaturas relativamente altas por um longo período de tempo. Outra desvantagem é que as estruturas obtidas por este tipo de síntese possuem tamanho e morfologia de partícula não uniforme, além de ser um método sem reprodutibilidade.

As reações de síntese de hidroxiapatita por reações no estado sólido basicamente são (90):

2.6.1.2 método mecanoquímico

O método mecanoquímico é um processo simples de reação não aquosa, que consiste em síntese no estado sólido, porém se aproveita da perturbação das ligações de espécies superficiais. Ao contrário da reação de estado sólido, onde partículas heterogêneas e com formato irregular eram geralmente sintetizadas, os cristais sintetizados pelo método mecanoquímico apresentam uma estrutura bem definida. E isto ocorre graças à perturbação das espécies ligadas à superfície resultante da pressão aplicada, melhorando as reações termodinâmica e cinética entre os sólidos (199-203). Este método possui baixo custo, produz partículas com alta cristalinidade, normalmente não estequiométricas, morfologia diversa e tamanho da ordem de nanômetros (199-205).

As principais variáveis deste tipo de método incluem reagentes utilizados, tipo de meio de moagem, o tipo e diâmetro de bolas do moinho de bolas, a duração da moagem e os intervalos de pausa e a velocidade de rotação (202, 205-210).

2.6.2 Reações em meios aquosos ou método via úmida

As partículas sintetizadas pelos métodos não aquosos são de um modo geral irregulares no formato e grandes no tamanho. Por isso, métodos aquosos têm sido convencionalmente aplicados para sintetizar HA em escala nanométrica e com morfologia regular. Este é o método mais utilizado pela comunidade científica, já que apresenta como principal vantagem a habilidade de controlar a morfologia e o tamanho médio das partículas, cujas propriedades se enquadram nos requisitos de biocompatibilidade. No entanto, este método também possui desvantagens, entre elas está a baixa temperatura de síntese comparada com

os métodos secos, resultando no aparecimento de diferentes fases de fosfato de cálcio além da hidroxiapatita e/ou partículas com baixa cristalinidade. Além disso, vários íons presentes na solução aquosa podem ser incorporados na estrutura do cristal levando a sinais de impureza (192). Em métodos aquosos, a temperatura geralmente não excede os 100°C e podem ser sintetizados cristais de tamanhos manométricos (93). Quando utilizamos os métodos aquosos, a HA obtida geralmente é deficiente em cálcio (90). E como são produzidas em baixas temperaturas possuem baixa cristalinidade e tamanho menor dos cristais (nanométricos), características similares às do tecido ósseo e dentários, tornando-as mais interessantes para aplicações biológicas (146).

Os métodos aquosos podem envolver reações ácido-base de neutralização ou reações entre sais de fosfato e cálcio. Dentre os métodos aquosos nós temos como os mais utilizados pela comunidade científica: método de precipitação, método por hidrólise, método sol-gel e método hidrotermal.

2.6.2.1 método de precipitação

Entre os métodos aquosos, o método de precipitação é considerado o mais simples e, por isso, o mais utilizado. Este método é baseado no fato de que, a partir de soluções aquosas contendo íons de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- , à temperatura ambiente e $\text{pH}=4,2$, a HA é a menos solúvel e geralmente a mais estável fase de fosfato de cálcio, levando assim à formação de cristalitos insolúveis de HA (170, 211-216). No entanto, a reação pelo método de precipitação geralmente é conduzida com valores de pH mais altos que 4,2 e temperaturas em um intervalo entre a temperatura ambiente e a temperatura próxima ao ponto de ebulição da água (217-219).

Para a produção de partículas de HA a precipitação química pode ser realizada utilizando vários tipos de reagentes contendo cálcio e fosfato, como por exemplo: hidróxido de cálcio ou nitrato de cálcio como fontes de íons Ca^{2+} e ácido ortofosfórico ou diamônio hidrogenofosfato como fontes de PO_4^{3-} (129, 131, 192, 220-222).

Os dois tipos de reações mais comuns para precipitar CaP foram baseados em métodos desenvolvidos por Rathje em 1939 (método de titulação) e Hayek e

Newesely em 1963 (90). O método de Rathje consiste em adicionar gota a gota ácido fosfórico a uma suspensão, sob agitação, de hidróxido de cálcio de acordo com a reação abaixo:

O método de Hayek e Newesely consiste em uma reação entre nitrato de cálcio e fosfato de amônio com a adição de hidróxido de amônio. A principal desvantagem deste método é a contaminação do produto final pelo íon nitrato, requerendo lavagens intensivas para sua remoção. Este método acontece de acordo com a reação abaixo:

A maior dificuldade dos métodos de precipitação é o controle das variáveis que influenciam a reação de precipitação, ou seja, pH, temperatura, razão Ca/P dos reagentes podendo levar a produtos finais com diferentes estequiometrias, cristalinidade e morfologia, contribuindo para diferentes comportamentos *in vivo* e *in vitro* (170). Dentre os parâmetros do processo de precipitação que necessitam de uma atenção maior pode-se citar o pH, temperatura de obtenção, concentração molar dos reagentes, tempo de agitação, tempo de envelhecimento e a velocidade de titulação, esta última está diretamente relacionada à cinética de reação. Essas são as variáveis críticas para pureza e características cristalográficas do material obtido (90). A composição dos reagentes está relacionada à pureza do material, que pode ou não apresentar íons inesperados na rede, além de diferenças nas características morfológicas e cristalográficas. A velocidade de gotejamento ou titulação influencia a taxa de nucleação, ou seja, a adição lenta de íons fosfato na solução de cálcio proporciona menor taxa de nucleação e maior taxa de crescimento, implicando em obtenção de partículas maiores (223).

As partículas produzidas por este método são geralmente não estequiométricas, com baixa cristalinidade, morfologia irregular, porém nanométricas (224-226). As partículas sintetizadas podem ter formato tipo agulha/esférica ou nanobastões (227).

O método de precipitação é simples e de baixo custo entretanto, o controle do processo de preparação é difícil e as partículas sintetizadas facilmente se agregam. Esta agregação tem sido superada pela adição de dispersantes orgânicos, polímeros ou tensoativos (227).

Recentemente, Paz et al. reportou o uso de soluções supersaturadas de cálcio como uma forma de biomimetizar o processo de preparação das nanopartículas de HA. Além disso, este estudo mostrou que a morfologia, cristalinidade e distribuição de tamanho das nanopartículas resultantes são extremamente dependentes do método de síntese e do tempo de envelhecimento das partículas (228).

2.6.2.2 Método de hidrólise

As nanopartículas de HA podem ser sintetizadas através da hidrólise de outras fases de CaP, como monetita ou fosfato dicálcico anidro - CaHPO_4 , brushita ou fosfato dicálcico dihidratado - $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e whitlockita ou fosfato tricálcico – $\beta\text{-TCP}$ – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (192). Antigamente, utilizava-se também OCP ou fosfato octocálcico para as reações de hidrólise, porém atualmente para a síntese de HA não se tem mais utilizado, provavelmente devido a sua baixa velocidade de hidrólise e também à capacidade do OCP em incorporar impurezas (229, 230).

Este método é utilizado geralmente quando se deseja transformar um CaP disponível comercialmente ou então já preparado em HA. Apresenta um alto custo, as partículas sintetizadas possuem morfologia diversa, cristalinidade e tamanho variável, no entanto são estequiométricas (229-234).

Entre os sais de fosfato de cálcio, as fases ácidas como a monetita e a brushita são termodinamicamente menos estáveis em pH acima de 6 - 7 e são transformadas em uma fase mais estável como, por exemplo, a HA (232-236).

2.6.2.3 método de sol-gel

A técnica de sol-gel foi um dos métodos pioneiros dentre as vias aquosas de síntese de HA. Este processo é um método químico via úmida, o qual dispensa a utilização de alto vácuo e temperaturas elevadas. Tem como vantagens a mistura dos reagentes em nível molecular, melhorando a homogeneidade química do pó sintetizado (237-240). Geralmente são exigidas temperaturas elevadas (acima de 1000°C) para a sinterização de cristais de HA por outros métodos aquosos, enquanto que para este método temperaturas menores são suficientes para a calcinação e sinterização da HA, levando a uma diminuição da degradação durante a sinterização. Outra vantagem é que as partículas sintetizadas através deste método geralmente exibem estequiometria, área superficial aumentada e menor tamanho de partículas (nanométrico) (241-245).

Um estudo realizado *in vitro* demonstrou melhor reabsorção da HA sintetizada por sol-gel (similar a apatita biológica) em relação ao pó convencional da HA (246). Entretanto, este método tem como principal desvantagem a geração de uma segunda fase, o óxido de cálcio (CaO). Estudos mostram o óxido de cálcio como prejudicial à biocompatibilidade da HA e portanto, deve se ter o cuidado de remover todo o CaO, lavando o pó com solução ácida (principalmente HCl) ou modificando o procedimento de síntese, através do aumento do tempo de envelhecimento por exemplo (247-249).

O processo sol-gel convencional envolve uma transição do sistema sol para um sistema gel. A escolha dos precursores e solventes para a obtenção do sol deve ser feita optando pela utilização dos reagentes mais reativos, que em geral são os alcóxidos dos respectivos cátions e ânions que devem compor a fase inorgânica final desejada. Os precursores geralmente são solúveis em álcoois e as reações de hidrólise e condensação do precursor permitem a formação de partículas de tamanho coloidal (sol) homogêneo e posterior formação da rede tridimensional (gel). Podem ser utilizados alcóxidos de metais ou sais de metais como precursores. Os alcóxidos apresentam alto custo, o que

encarece o método (250-254). No entanto, para a síntese de hidroxiapatita, os alcóxidos de cálcio e fósforo não são os precursores mais indicados. Os precursores mais indicados são o ácido fosfórico e o nitrato de cálcio que são solúveis em álcool e água, minimizando o problema de elevada volatilidade do solvente e baixa reatividade dos precursores quando se utiliza trietil fosfato por exemplo (189). Os precursores são utilizados para a preparação da rede inorgânica tridimensional através da mistura destes em um solvente aquoso ou orgânico seguido de envelhecimento a temperatura ambiente, gelificação, secagem em um prato quente e remoção dos resíduos orgânicos do gel seco resultante, através da utilização de um tratamento térmico posterior (calcinação) (250-254).

Na fase de solução, a reação entre os precursores de cálcio e fosfato ocorre lentamente, por isso é necessário um longo período de envelhecimento para a formação da fase apatita. Além disso, o tratamento térmico posterior também influencia bastante na formação de HA pura, pois ele deve ser capaz de eliminar resíduos orgânicos, produtos gasosos e moléculas de água do gel poroso (240, 251, 255). Um tempo de envelhecimento insuficiente e/ou uma gelificação não controlada e tratamento térmico podem acarretar na geração de várias impurezas, principalmente CaO (óxido de cálcio), $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (pirofosfato de cálcio), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (fosfato tricálcico) e CaCO_3 (carbonato de cálcio) (247, 248). Além disso, a taxa de geleificação, a natureza do solvente, a temperatura e o pH empregado durante o processo são extremamente dependentes da natureza química dos reagentes utilizados na síntese por sol-gel. Assim como em outros métodos aquosos, diversos tipos de precursores (fontes de cálcio e fosfato) podem ser empregados. Os mais utilizados são dietóxido de cálcio ou nitrato de cálcio reagindo com trietilfosfite ou trietilfosfato, em solução aquosa ou em solução orgânica (252, 254, 256, 257).

Um representação geral da reação que ocorre durante a síntese por método sol-gel é a seguinte:

Um estudo que sintetizou nanopartícula de HA utilizando a reação representada acima, mostrou que a rápida gelificação gerou maior quantidade

de CaO enquanto a gelificação lenta resultou em menores quantidades de CaO que pode ser facilmente removido por lavagens com água destilada (248).

2.6.2.4 método hidrotermal

O método hidrotermal é considerado um dos mais comuns para a síntese de hidroxiapatita e como o próprio nome já diz, utiliza reações químicas em soluções aquosas sob elevada temperatura e pressão para facilitar a precipitação dos cristais (258).

O método hidrotermal também pode ser considerado como um método de precipitação no qual a fase de envelhecimento é conduzida sob alta temperatura, geralmente acima do ponto de ebulição da água, dentro de uma autoclave ou recipiente de pressão (259-265).

O método hidrotermal geralmente produz partículas unidimensionais como, por exemplo, partículas com formato de nanotubos ou agulhas, possuindo capacidade de induzir crescimento em uma das dimensões. No entanto sínteses de partículas com outras morfologias, através da utilização de condições específicas e/ou aditivos, também têm sido reportada. O método hidrotermal é considerado o terceiro método mais popular de síntese de nanopartículas de HA, ficando atrás apenas do método de precipitação e da combinação de diferentes métodos. As partículas sintetizadas por este método apresentam-se estequiométricas e com alta cristalinidade (266-271). Através do aumento da temperatura durante o uso do método hidrotermal é possível a síntese de partículas com melhor pureza de fase e razão Ca/P (272-276).

Não existe ainda um consenso quanto as melhores condições experimentais para a obtenção de partículas de HA com as melhores características. Sabe-se, que a 200°C durante 24 horas, apenas HA é sintetizada, porém em tempos maiores de 48 e 72 horas, na mesma temperatura, há a formação de monetita, além da HA (277). Alguns estudos apontam que um meio com pH ácido é o melhor para síntese de nanotubos de

HA (269, 277, 278) outros com pH próximo do neutro (279, 280) e outros em meio alcalino (267, 281, 282).

A formação dos cristais com formato de hastes através do método hidrotermal parece compreender dois principais estágios: uma fase inicial de nucleação onde partículas com baixa cristalinidade são formadas em um meio supersaturado (reação dos íons) e posteriormente um estágio de crescimento, onde as partículas crescem continuamente até atingirem formato e tamanho final (tratamento hidrotermal) (283, 284). Neste método, assim como na maioria dos métodos, o pH e a temperatura são os fatores que afetam mais significativamente as características estruturais e morfológicas das nanopartículas (283, 285).

Este método apresenta como principal desvantagem a baixa capacidade de controle da morfologia e da distribuição de tamanho das nanopartículas durante o processo de síntese, assim a morfologia das partículas obtidas por um método hidrotermal simples é geralmente irregular ou esférica, ou em formato de bastão com uma ampla distribuição de tamanho, por exemplo: 0,7–3 μm (268), 10-80 nm (272) ou 9-152 nm (286), ou em formato de agulha com 20–40 nm de diâmetro e 100–160 nm de comprimento (277). Entretanto, assim como outras reações químicas de precipitação é possível controlar o crescimento dos cristais através do uso de modificadores orgânicos como agentes quelantes de cálcio ou então diversos tipos de surfactantes orgânicos (287-291).

2.7 Métodos de modificação da síntese

Como já foi mostrado anteriormente, todos os métodos possuem vantagens e desvantagens, independentemente de ser um método seco ou úmido. A fim de tentar controlar as desvantagens de cada método, ou então como uma forma de aprimoramento de cada método, foram surgindo modificações dos métodos padrões de síntese. É possível modificar a síntese através de alterações nos parâmetros dos métodos já existentes, como pH, temperatura da reação de

calcinação (se aplicável), método de secagem, velocidade e modo de agitação dos reagentes, os tipos de solventes e a concentração dos reagentes (292-295).

Wang et al. utilizaram o método hidrotermal e investigaram o efeito do tipo de solvente (água pura ou mistura de água com etanol) e o tipo de secagem (à pressão atmosférica com vácuo ou liofilizados) nas características finais do pó sintetizado. Concluíram que aumentando a proporção de etanol no solvente o tamanho da partícula aumenta e a solubilidade diminui devido a supersaturação. Nanopartículas sintetizadas utilizando água como solvente apresentavam tamanho de 20-30 nm enquanto que em etanol o tamanho aumentava para o intervalo de 100-150 nm. Isto acontece porque a HA possui baixa solubilidade em água e muito menor em etanol, levando a um aumento na supersaturação e consequente aumento no crescimento dos cristais. Além do tipo de solvente, o método de secagem também influenciou na morfologia e solubilidade das partículas sintetizadas. O tamanho das partículas que foram secas por métodos de secagem atmosférica eram menores que as secadas pelo método de liofilização. Além disso, partículas secas sob vácuo apresentavam formatos esféricos, com pequenos bastões e baixa solubilidade. Conclui-se que as partículas secas por liofilização apresentam estrutura ultrafina e com melhor solubilidade (296).

Pramanik et al., modificando o método de reação de estado sólido, através do uso de um misturador de pó e prensagem a frio conseguiram obter partículas de hidroxiapatita com fase única, porém irregulares e da ordem de micrômetros (193). Tas et al. utilizaram um método de reação de estado sólido modificado denominado “síntese do sal fundido” para preparar hidroxiapatita unidimensional. Esta técnica modificada utiliza baixo ponto de fusão e agentes fundentes como cloretos alcalinos, sulfatos, carbonatos ou hidróxidos, como o meio de reação. Tas et al. mostraram que utilizando esta técnica com K_2SO_4 como agente fundente foi possível a síntese de hidroxiapatita de tamanho pequeno em um intervalo de temperatura de 1080 – 1200°C (196).

Também é possível modificar os métodos existentes através da utilização de aditivos durante a síntese. Tseng et al. sintetizaram nanopartículas de hidroxiapatita através de uma reação de estado sólido na presença de polietilenoglicol (PEG) e utilizando a calcinação de fosfato dihidrogenado de cálcio e hidróxido de cálcio a 900°C. Sintetizaram partículas de HA com alta

cristalinidade, da ordem de nanômetros e sem sofrer agregação. Tseng et al., demonstraram que o PEG é capaz de controlar o tamanho da partícula, a fase do cristal e o grau de agregação (198).

Apesar das tentativas e dos esforços em tentar compensar as desvantagens apresentadas pelos métodos não aquosos, assim como já mencionado anteriormente, estes métodos geralmente apresentam má difusão dos íons durante a reação, o que é inerente ao método, e é o motivo pelo qual pouco se utilizam métodos sólidos para síntese de HA ou, então, optam pelo método mecanoquímico (192).

Atualmente, existem muitos estudos utilizando adição de macromoléculas durante o processo de síntese pelo método hidrotermal. Estas moléculas controlam o crescimento dos cristais orientando assim o seu formato final e evitando a aglomeração de partículas, problema muito comum na síntese de partículas nanométricas que tendem a se aglomerarem (297-300).

Os surfactantes são uma classe de compostos que possuem a propriedade de reduzir tensões interfaciais. A sua denominação deriva do inglês "*surface active agent*", agente de atividade superficial. Elas são moléculas anfifílicas, ou seja, são constituídas por um grupo polar (cabeça hidrofílica) e uma cadeia, ou duas, de hidrocarbonetos não polares (hidrofóbica). Possuem tendência à formação de micelas (do latim "pequenos agregados") que geralmente se formam a baixas concentrações em água. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas é denominada concentração micelar crítica. E assim, quando dissolvidos em água, a uma determinada concentração, se auto associam, ou seja se agregam entre si formando micelas, onde os grupos polares e a água por meio de forças eletrostáticas interagem. Nas micelas, a porção lipofílica das moléculas ou íons fica orientada para o interior e apenas os grupos polares ficam na parte externa, em contato com a água. Forças eletrostáticas concentram compostos hidrofílicos junto à superfície das micelas e os compostos lipofílicos podem ser solubilizados em seu interior (298-301).

Os surfactantes mais utilizados para síntese de HA são polietilenoglicóis (PEG) de diferentes pesos moleculares, brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), Tweens e polímeros polivinilpirrolidona (PVP).

Liu et al. sintetizaram nanotubos de HA com intervalo de 50–80 nm de diâmetro e 0,5–1,2 μm de comprimento, utilizando surfactantes CTAB e PEG 400 (300).

Zhang e Zhu et al. controlaram a morfologia das nanopartículas de hidroxiapatita fluoretada usando *Tween* 80. Afirmaram que a modificação na morfologia ocorreu como resultado da diferença entre as taxas de crescimento das faces do cristal devido a adsorção do *Tween*. Entretanto, sem a adição de nenhum surfactante a hidroxiapatita fluoretada apresentou formato esférico com uma distribuição de tamanho ampla, variando de 80–300 nm. Já a hidroxiapatita fluoretada sintetizada na presença de *Tween* 80 apresentou tamanho uniforme, com formato de bastão e diâmetro médio de 50 nm (302).

Muitos estudos têm sido realizados a fim de descobrir como o PEG atua sobre a precipitação química das nanopartículas de HA (300, 303-305). De acordo com os estudos, as moléculas de PEG modificam a superfície dos nanocristais e atuam como agente dispersante durante o processo de síntese. Qiu et al. sintetizaram HA esférica com diâmetro de 30-50 nm na presença de PEG, mostrando que a presença de PEG aumenta a cristalinidade. PEG reduz a taxa de transferência de íons Ca^{2+} durante o processo de cristalização da HA. Quando PEG é dissolvido na solução aquosa, inicialmente há a formação de ligação entre o PEG e a molécula de OH, que então se liga aos íons Ca^{2+} liberados do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ para formar $\text{PEG-O-Ca}^{2+}\text{-O-PEG}$, que então reage com o PO_4^{3-} do $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ para a produção dos núcleos de cristalização de HA. Descobriu-se que na ausência de PEG ocorre a rápida deposição e, portanto, a rápida geração de há. Com a introdução do PEG a deposição inicial reduz-se gradualmente, necessitando de um maior tempo para a produção de grande quantidade de partículas. Esse achado indica que PEG reduz a taxa de Ca^{2+} e consequentemente reduz a velocidade de formação dos cristais de HA (305). Em outro estudo Qiu et al. mostraram o uso de um outro surfactante, o polímero polivinilpirrolidona (PVP), que também exerce um papel estabilizador durante a síntese, retardando o crescimento do cristal e prevenindo a aglomeração (306).

Além das macromoléculas, alguns estudos têm mostrado o uso de compostos orgânicos menores. Li et al., por exemplo, prepararam nanopartículas de HA utilizando ácido cítrico como agente quelante sugerindo que esses agentes inibem o crescimento do cristal resultando em encurtamento do eixo a e

alongamento do eixo c dos cristais (307). Martins et al. descreveram um método de precipitação em temperatura fisiológica (37°C) de partículas de HA com formato de agulha através da utilização de moléculas de citrato e pequenas variações no pH inicial da solução. As moléculas de citrato atuam como agentes quelantes de cálcio, controlando a disponibilidade de íons cálcio durante a síntese, e consequentemente a taxa de nucleação. As moléculas de citrato adsorvem em algumas faces preferenciais do cristal, controlando a estabilidade e morfologia das nanopartículas (308).

2.8 Composição e características morfológicas do esmalte e da dentina

O esmalte é o tecido que recobre a porção coronária dos dentes e é o mais mineralizado do organismo. Ele se difere dos demais tecidos calcificados por possuir origem epitelial (do ectoderma) e por ser o único completamente acelular depois de totalmente formado. O esmalte possui uma estrutura homogênea composta por 97% de mineral, 2% de água e 1% de material orgânico em peso. Este alto conteúdo inorgânico justifica a sua dureza e o torna extremamente friável. A hidroxiapatita representa quase que a totalidade da composição inorgânica. Carbonatos, sódio, cloreto, magnésio, potássio e flúor podem ser encontrados, porém em menor quantidade (3). A estrutura cristalina do esmalte é composta de prismas, que são barras ou colunas mais ou menos cilíndricas e têm seu início na junção amelodentinária e término quase sempre na porção externa (309). Os cristais de hidroxiapatita possuem uma espessura de 20 a 60 nm, largura de 30 a 90 nm, variando no comprimento. Eles estão densamente empacotados e se dispõem seguindo mais ou menos a orientação do longo eixo dos prismas (3).

A dentina possui composição e características morfológicas diferentes do esmalte. Para que consiga exercer sua principal função estrutural, que é fornecer suporte ao esmalte, ela necessita ser, ao mesmo tempo, um tecido duro, porém com certa elasticidade. E isto é possível graças ao equilíbrio

existente entre os componentes minerais e orgânicos de sua composição (310). A dentina possui uma composição mais heterogênea, constituída de 70% mineral, 12% água e 18% material orgânico em peso. No entanto, é esta heterogeneidade que torna a dentina um tecido dentário naturalmente complexo. O principal componente inorgânico da dentina também são os cristais de hidroxiapatita. Já o componente orgânico é 85% composto por colágeno tipo I (3).

Morfologicamente a estrutura da dentina é composta por canais orientados denominados túbulos dentinários que percorrem todo seu comprimento fazendo a comunicação entre a câmara pulpar e a junção amelodentinária. Os túbulos convergem na câmara pulpar, ou seja, cada túbulo dentinário possui uma geometria similar à de um tronco de cone invertido, com a base maior voltada para a polpa. Portanto a distribuição dos túbulos, assim como a orientação e diâmetro, se dão de maneira bastante heterogênea, variando de acordo com a localidade no tecido. Os túbulos localizados junto à polpa possuem maior diâmetro, cerca de 2,5 μm , e estão presentes em maior número por unidade de área (mm^2), cerca de 45.000. Já os túbulos que chegam à junção amelodentinária possuem menor diâmetro, cerca de 1 μm , e estão presentes em menor número por unidade de área, aproximadamente 19.000 (3). Os túbulos dentinários são considerados vias de difusão de agentes nocivos assim como vias de transmissão de diversos estímulos sensitivos ao tecido pulpar (310). Os inúmeros túbulos atravessam toda espessura de dentina, e no seu interior encontram-se o fluido dentinário e as extensões celulares dos odontoblastos, fazendo a comunicação com a polpa (310). Admite-se que a sensibilidade dentinária esteja relacionada ao mecanismo hidrodinâmico do fluído contido no interior dos túbulos dentinários.

No entanto, o fluído dentinário não está relacionado apenas a sensibilidade dolorosa. Além disso, a sua presença confere a este tecido uma umidade intrínseca que influencia e dificulta os procedimentos adesivos (311, 312). Assim como há variação na densidade e diâmetro dos túbulos dentinários, o conteúdo relativo de fluido também sofre variação conforme a região, contribuindo ainda mais com a heterogeneidade deste tecido.

A dentina pode ser dividida em dentina peritubular e dentina intertubular. A dentina peritubular é a que circunda os limites do túbulo dentinário, constituindo

sua parede. É considerada hipermineralizada e origina-se através da deposição de cristais de hidroxiapatita entre os espaços vazios existentes na matriz orgânica formada pelos odontoblastos. A espessura da dentina peritubular também sofre alteração conforme a região da dentina, sendo de aproximadamente 0,7 mm junto ao limite amelodentinário e 0,4 mm próximo à pré-dentina (3, 313). Já a dentina intertubular é a que ocupa todo espaço entre os túbulos, entre as colunas de dentina peritubular. Ela constitui a maior parte da dentina e é caracterizada por possuir alto conteúdo orgânico formado principalmente por fibrilas colágenas que se encontram orientadas perpendicularmente ao longo eixo dos túbulos. Ela se origina da deposição mineral que ocorre sobre a matriz orgânica (3, 311). A área de superfície ocupada pela dentina intertubular varia regionalmente em proporção inversa aos túbulos dentinários, sendo que próximo à polpa encontra-se uma dentina predominantemente peritubular e com uma grande percentual de túbulos. Já na proximidade da região amelodentinária (de 3 a 3,5 mm da polpa), a dentina intertubular ocupa 96,2% da superfície (314, 315).

A matriz orgânica dentinária é constituída principalmente por fibras colágenas tipo I que são originadas da polimerização de uma unidade protéica alongada denominada tropocolágeno. A molécula de tropocolágeno consiste em uma proteína fibrilar, insolúvel, que mede 280 nm de comprimento e 1,5 nm de espessura. A sua estrutura é em tripla hélice, em que cada uma das 3 cadeias (“fitas”) polipeptídicas, dispostas em hélice, são compostas por inúmeros aminoácidos, destacando-se a glicina, prolina, lisina, hidroxiprolina e hidroxilisina. As moléculas de tropocolágeno se agregam para formação das fibrilas. Inicialmente esta agregação acontece através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, posteriormente, reforçadas por ligações covalentes. Nos colágenos tipo I as fibrilas formam fibras colágenas, podendo também formar feixes, através de ligações covalentes cruzadas entre as fibrilas. Tais ligações fortalecem e estabilizam a rede fibrilar, conferindo-lhes resistência mecânica (316, 317).

Na superfície destas fibrilas estão distribuídas algumas proteínas não colagenosas, como fosforina, sialoproteína e glicosaminoglicanas (GAGs). Essas proteínas interagem com o colágeno a partir de ligações que se estabelecem com moléculas de água fortemente adsorvidas ao colágeno, formando uma rede

de polímeros hidrofílicos (318). Esta rede polimérica se apresenta insolúvel devido à grande quantidade de ligações peptídicas presentes (22). No entanto, na presença de ácidos produzidos por bactérias ou proveniente de um condicionamento ácido, parte do conteúdo mineral é dissolvido, expondo assim as fibrilas colágenas e as demais proteínas, que diante desta situação ficam mais susceptíveis à degradação (22, 319). No entanto, devido a sua insolubilidade, o colágeno é resistente à degradação pela ação das proteases e assim, a sua degradação só irá acontecer através das enzimas collagenases que são capazes de clivar a tripla hélice (316).

Todas estas características morfológicas e estruturais inerentes à dentina a tornam um substrato complexo quando o assunto é sucesso clínico nos procedimentos adesivos.

2.9 Adesão

Antes da criação da técnica de condicionamento ácido de esmalte e dos sistemas adesivos a restauração de cavidades na odontologia era realizada através de retenções macro mecânicas. Nestes casos as cavidades precisavam ter uma conformação retentiva e esta exigência limitava a preservação de tecido dental sadio. Com o advento dos sistemas adesivos os preparos cavitários tornaram-se mais conservadores, preservando o máximo de estrutura dental sadia.

Após a observação do uso industrial do ácido fosfórico para o aumento da adesão de pinturas e coberturas de resina em superfícies de metal, Buonocore propôs o tratamento prévio do esmalte com ácido fosfórico, a fim de promover a desmineralização superficial deste tecido, criando irregularidades na superfície de esmalte que visam melhorar a retenção da resina (320-322). Posteriormente, estas irregularidades seriam preenchidas por uma resina que após a polimerização ficaria retida micro mecanicamente ao esmalte. Buonocore provou então que a retenção da resina, quando aplicada sobre a área do esmalte pré-

tratada com ácidos, era maior do que aquela obtida quando o material era aplicado sobre o esmalte não-tratado (1). O surgimento de formulações adesivas com monômeros hidrofóbicos promoveu maior durabilidade da união da restauração e o esmalte, pois restringem a sorção de água que qualquer material restaurador está sujeito na cavidade oral. A adesão em esmalte é facilmente obtida através do condicionamento ácido e utilização de um adesivo hidrofóbico, pois ele possui uma estrutura homogênea quanto à composição (3). Portanto, o processo de adesão em esmalte pode ser facilmente realizado e já está bem estabelecido na literatura e na clínica.

No entanto, os procedimentos restauradores não se restringem apenas à superfície de esmalte, pois o dente não é composto apenas por este tecido, a dentina também faz parte da sua composição. Além disso, na maioria das vezes as cavidades observadas na clínica odontológica abrangem dentina e esmalte (323).

A heterogeneidade da sua composição, a distribuição desigual em número e diâmetro de seus túbulos dentinários, a presença destas fibrilas colágenas insolúveis, assim como a sua umidade intrínseca tornam o sucesso dos procedimentos adesivos, em dentina, uma tarefa complexa.

Além disso, quando a dentina sofre a preparação para receber os procedimentos adesivos é formada sobre ela uma camada de esfregaço denominada *smear layer*. A *smear layer* é uma mistura composta por debris orgânicos (colágeno parcialmente desnaturado), hidroxiapatita, saliva, sangue, bactérias, abrasivos e óleo da turbina do motor. Esta camada de esfregaço recobre os componentes estruturais da dentina se depositando sobre a dentina intertubular e penetrando em alguns micrômetros no interior dos túbulos dentinários, obliterando-os e formando os *smear plugs* (324-328). Existem vantagens e desvantagens em se manter ou remover a *smear layer* previamente aos procedimentos adesivos. Antigamente, pensava-se que a camada de esfregaço podia reduzir a permeabilidade dentinária protegendo a polpa de possíveis agressões advindas dos materiais utilizados durante o procedimento de adesão (329, 330), além de reduzir o fluxo tissular proveniente da câmara pulpar (312). E por isso, os primeiros sistemas adesivos promoviam a união das restaurações à camada de esfregaço, sem a sua remoção prévia. No entanto, preservar a camada de esfregaço tem como a principal desvantagem, a fraca

retenção dos adesivos à *smear layer*, devido à baixa resistência de união desta camada à dentina subjacente (aproximadamente 5 MPa) (327, 331, 332). Assim, devido a esta desvantagem e seguindo a conduta pioneira de Buonocore, em 1979 Fusayama et al, propuseram o uso do condicionamento ácido em dentina previamente a realização do procedimento adesivo, a fim de remover a *smear layer* que prejudicava a adesão à dentina subjacente (333). Além disso, o condicionamento ácido em dentina remove a parte mineral ampliando o diâmetro dos túbulos, aumentando a permeabilidade dentinária e expondo as fibras colágenas. Viabilizando assim a infiltração de monômeros resinosos para o interior dos túbulos dentinários e entre as fibras colágenas expostas (334).

Os sistemas adesivos desenvolvidos a partir daí baseavam-se na utilização do condicionamento ácido prévio na dentina para a exposição das fibrilas colágenas e também na infiltração de monômeros resinosos por entre estas fibrilas expostas mantendo assim um arcabouço expandido após a polimerização da resina. E a este conjunto de fibras colágenas infiltradas por monômeros resinosos, denominou-se camada híbrida. A camada híbrida é assim denominada devido a esta mistura de conteúdo orgânico proveniente da dentina desmineralizada com os monômeros resinosos advindos dos sistemas adesivos (335).

A adesão da resina à dentina foi primeiramente alcançada em 1982, através da hibridização entre a resina e as fibrilas colágenas utilizando resina contendo monômeros funcionais (335). Como já foi dito anteriormente, o condicionamento ácido em dentina é necessário para se alcançar uma desmineralização superficial que resulta em uma estrutura menos mineralizada e mais rugosa. No entanto, a remoção parcial de estrutura inorgânica e exposição da porção orgânica, provoca um aumento da permeabilidade dentinária, tornando o substrato de adesão mais úmido, fazendo com que o fluido tubular fique em contato com o material resinoso. Além disso, a umidade da dentina é necessária durante o procedimento adesivo para a manutenção do arcabouço colágeno, preservando os espaços interfibrilares (antes ocupados pelos cristais de hidroxiapatita) necessários para a perfeita infiltração dos monômeros resinosos (22, 336). Se a umidade da dentina não for mantida após o condicionamento ácido, as fibrilas colágenas tendem a colapsar, dificultando a difusão dos monômeros (312, 337, 338).

Devido à necessidade deste ambiente úmido, em 1992, foi proposta a técnica úmida de hibridização da dentina, na qual após o condicionamento ácido, é feita a remoção do ácido através da lavagem com água. Entretanto, a água deve ser mantida sobre a matriz desmineralizada, através da utilização controlada do jato de ar, para que esta possa ocupar os espaços entre as fibrilas colágenas evitando o seu colapamento (309, 339-341). A água não só ocupa o espaço fisicamente entre as fibrilas como também é capaz de romper pontes de hidrogênio formadas entre as cadeias polipeptídicas das fibrilas, mantendo-as afastadas (312, 342).

Embora haja a necessidade desta relativa umidade, o excesso de água prejudica a completa penetração dos monômeros para o interior dos espaços interfibrilares, já que a água compete com o monômero por esses espaços, além de provocar a diluição dos monômeros e alteração de suas propriedades (343-347). É fundamental um cuidadoso controle da umidade dentinária para que haja a formação perfeita de uma camada híbrida e, assim, maior durabilidade da restauração.

A necessidade desta umidade relativa faz com que este substrato passe a ter menos capacidade de interagir com monômeros resinosos hidrofóbicos, antes utilizados em esmalte. Para isto foram desenvolvidos os *primers*, soluções formadas por solventes orgânicos polares misturados a monômeros hidrofílicos que, possibilitam o aumento da interação entre as fibras colágenas e a resina hidrofóbica. Os solventes orgânicos além de facilitar a penetração dos monômeros resinosos para o interior da matriz orgânica desmineralizada, também provocam a evaporação da água presente no interior desta matriz à medida que o monômero vai penetrando, garantindo a perfeita interação sem que haja a contração do colágeno. Após a interação do *primer* com as fibrilas, a incorporação do *bond* e a polimerização há a formação da camada híbrida (20, 348, 349). A camada híbrida é uma estrutura composta por fibrilas colágenas tipo I e proteoglicanas envolvidas por cadeias poliméricas (350, 351). A matriz desmineralizada da dentina precisa ser completamente infiltrada com a resina do adesivo para então formar a camada híbrida (335, 351, 352).

Uma camada híbrida perfeitamente formada e composta por fibrilas colágenas envolvidas por resina à base de metacrilato têm sido considerado

como fator essencial para sucesso e durabilidade da adesão da resina em dentina.

Atualmente, dentre as técnicas adesivas disponíveis, a mais utilizada clinicamente ainda é a técnica adesiva de condicionamento ácido total ou também denominada de *etch&rinse* (353). Esta técnica pode apresentar variações de acordo com a apresentação dos frascos de ácido, *primer* e adesivo (*bond*). A técnica é realizada em três passos clínicos quando os componentes são apresentados em múltiplos frascos e portanto aplicados separadamente. É realizado o condicionamento com ácido fosfórico, seguido de lavagem, controle na manutenção da umidade dentinária, aplicação do *primer* e, em seguida, a aplicação do *bond*. Entretanto, o *primer* e o *bond* também podem ser apresentados em um frasco único, sendo aplicados simultaneamente, diminuindo um passo clínico (354).

Além do controle da umidade é necessário o cuidado com o condicionamento ácido excessivo ou sobre-condicionamento ácido da dentina (15) que resulta em uma exposição excessiva de fibrilas colágenas que dificilmente conseguirão ser totalmente envolvidas pelos monômeros resinosos (312, 355-357) resultando em uma camada híbrida com falhas (fibrilas colágenas não envolvidas por monômero) que diminuem a resistência de união (15) e, consequentemente, a durabilidade da restauração (358).

Diante das dificuldades e sensibilidade apresentadas pela técnica úmida de condicionamento total, especialmente relacionadas a necessidade do controle cuidadoso da umidade para a infiltração dos monômeros hidrofílicos dos *primers* somados ao problema do condicionamento ácido excessivo, tentou-se novamente preservar a camada de esfregaço (*smear layer*) através da adição de monômeros hidrofílicos ácidos em grande quantidade na formulação dos *primers* (359). O ácido presente na formulação têm como objetivo condicionar a *smear layer* dissolvendo parte da camada de esfregaço e da dentina subjacente, infiltrando simultaneamente para o interior dos túbulos dentinários e entre os espaços deixados após este condicionamento (359, 360).

Assim, na tentativa de não só diminuir o número de passos clínicos mas, também eliminar a etapa mais sensível da técnica adesiva, ou seja, a lavagem do ácido condicionante e sua posterior secagem cuidadosa, surgiram os adesivos autocondicionantes ou *self-etch* (361). Estes sistemas também são

apresentados em dois frascos, onde o *primer* autocondicionante (*self-etching primers*) e o *bond* estão presentes em frascos separados, exigindo duas etapas clínicas, ou ainda os chamados adesivos autocondicionantes de passo único, (“*all in one*”) que exigem uma única etapa clínica para aplicação do sistema adesivo, isto quer dizer que há aplicação do condicionamento ácido, *primer* e *bond* em uma única etapa clínica, já que estes componentes encontram-se contidos em um único frasco (362).

Apesar da facilitação da técnica, os adesivos autocondicionantes não apresentaram clinicamente bons resultados como era esperado, já que, devido à sua característica extremamente hidrofílica a camada híbrida por eles formada se comporta como uma membrana semipermeável, permitindo a movimentação de água e difusão de fluidos através da interface adesiva, mesmo após a polimerização (6, 363-365).

Apesar dos avanços significantes alcançados pelos sistemas adesivos ao longo do tempo a interface adesiva continua sendo a área de maior fragilidade das restaurações. Pigmentação e má adaptação marginal com subsequente perda de retenção da restauração são os achados clínicos mais frequentes (4, 5). Apesar de estudos mostrarem excelente efetividade da adesão imediata e a curto prazo (6), a durabilidade e estabilidade da interface adesiva em dentina permanece questionável (7-11). Estudos recentes ressaltam que valores de resistência adesiva imediata em dentina não se correlacionam com a estabilidade da adesão em longo prazo (10).

Portanto, a longevidade da adesão entre resina e a matriz dentinária ainda é uma preocupação (10). Muitos estudos mostram que a adesão entre resina e dentina obtida pelos adesivos dentinários hidrofílicos falham com o tempo (12-19). Sendo esta falha associada a problemas provenientes a má estruturação da camada híbrida. Uma das causas seria a incompleta infiltração dos monômeros resinosos no interior da matriz dentinária, resultando em uma camada híbrida com fibrilas colágenas expostas e, portanto, susceptíveis à hidrólise (14, 20-23). A outra causa seria a ação das metaloproteinases, enzimas que degradam o colágeno exposto e não foi infiltrado pelos monômeros provenientes dos sistemas adesivos (29, 31-33).

Evidências morfológicas de degradação hidrolítica do colágeno somadas ou não à hidrólise do componente resinoso na interface de restaurações antigas tem sido encontradas em diversos estudos *in vivo* (12, 13, 16).

A combinação da degradação da resina e do colágeno aumentam o teor de água na interface adesiva, levando a efeitos prejudiciais na longevidade da adesão. A água tem sido apontada como a principal causa da degradação do colágeno e da resina. No interior da camada híbrida podem ser observados dois tipos de degradação: perda da resina nos espaços interfibrilares e desorganização da fibrilas colágenas (12).

A hidrólise é um processo químico onde há quebra das ligações covalentes entre polímeros através da adição de água nas ligações éster, resultando em perda de massa da resina/colágeno, sendo a hidrólise da resina considerada a principal causa da degradação da camada híbrida (11, 366), contribuindo para redução nos valores de resistência adesiva ao longo do tempo (21, 23, 366-368).

A degradação da resina está diretamente relacionada com a sorção de água no interior da camada híbrida. Estudos reportam baixa sorção de água pelas resinas hidrofóbicas e quanto maior a hidrofiliabilidade da resina maior a sorção de água. Resinas altamente hidrofílicas, geralmente utilizadas pela técnica de autocondicionamento, possuem maior sorção de água. A sorção de água também causa baixa significativa do módulo de elasticidade das resinas, contribuindo na baixa da resistência adesiva, independentemente da hidrólise da resina (23, 369, 370).

Estudos mostram que as resinas hidrofílicas são, inerentemente, menos resistentes (371), já que a conversão de monômeros em polímeros em um ambiente úmido origina polímeros mais frágeis (26, 372) e, portanto, mais susceptíveis à degradação hidrolítica (quando comparado à resinas hidrofóbicas), logo mais vulnerável à sorção de fluídos intra orais (369, 370, 373) que provocam falhas na interface dentina/resina ao longo do tempo (362, 364, 374).

No entanto, as falhas na interface resina-adesivo vêm sendo relacionadas não apenas à perda de estabilidade dos componentes hidrofílicos da resina que compõem a camada híbrida, mas também, à capacidade proteolítica da dentina, devido à presença das MMPs.

As metaloproteinases pertencem ao grupo de enzimas zinco e cálcio dependentes (375), e estão presas a matriz da dentina desmineralizada durante

o processo de desenvolvimento do dente (376). Estas proteinases exercem um papel central em diversos processos fisiológicos como desenvolvimento, remodelação tecidual e angiogênese. A dentinogênese, por exemplo, é um fenômeno fisiológico que exige a ação de diferentes proteinases, principalmente da família das metaloproteinases (377, 378).

Estas proteases presentes em diversos tecidos conjuntivos, inclusive em dentina, parecem ter um importante papel na degradação das fibrilas colágenas que são expostas ao sistema adesivo após o condicionamento ácido. Após a aplicação da resina sobre a dentina desmineralizada, geralmente ficam expostas algumas fibrilas colágenas especialmente na porção profunda da camada híbrida, devido a um escoamento imperfeito da resina sobre a matriz da dentina desmineralizada. Estas fibrilas expostas provavelmente são atacadas pelas MMPs induzindo uma degradação hidrolítica. Assim, com a degradação do colágeno há falha na adesão e comprometimento do processo restaurador (28, 32, 379, 380).

O grande objetivo dos procedimentos adesivos é a completa infiltração e o total encapsulamento das fibrilas colágenas pela resina para sua proteção contra a degradação (12, 381). Sabe-se que o grau de envolvimento das fibrilas colágenas é diferente dependendo do tipo de sistema adesivo utilizado, sendo que cada tipo apresenta vantagens e desvantagens. A técnica de condicionamento total da dentina (*total-etch*) apresenta baixo grau de difusão do monômero resinoso para o interior da dentina condicionada resultando em zonas infiltradas de modo incompleto principalmente na zona mais profunda da camada híbrida que, contem fibrilas colágenas expostas e não envolvidas por resina. Isto acontece devido a discrepância entre a profundidade do condicionamento ácido e a infiltração da resina (12, 382-384). Esta má infiltração ocorre em grande parte, devido à insolubilidade de monômeros mais hidrofóbicos, como o Bis-GMA, em água (água presente da dentina úmida, utilizando a técnica úmida de adesão) (385). Diante dos fatos de que monômeros hidrofílicos geram polímeros mais frágeis, que a infiltração de monômeros mais hidrofóbicos em dentina saturada com água é incompleta, foi proposto, em meados de 2006, a utilização de monômeros mais hidrofóbicos sobre uma dentina desmineralizada e expandida em solventes anidros (livres de água), como o etanol (386) mostrando altos valores de resistência de união ao longo do tempo (387). Portanto, a

técnica de adesão “*ethanol-wet bonding*” permite o uso de resinas hidrofóbicas, que absorvem menos água (388). No entanto, um estudo realizado em 2007 mostrou que apesar dos adesivos hidrofóbicos serem capazes de selar melhor a dentina, quando saturada com etanol, a técnica não produziu uma interface 100% impermeável. E isto, provavelmente, estaria associado à rápida substituição da água por etanol, causando uma pequena contração das fibrilas colágenas que resulta em uma infiltração incompleta dos monômeros (389). Mais recentemente, em 2009, um estudo não encontrou diferença na resistência e longevidade da interface, em até seis meses, entre a interface formada por adesivos hidrófobos aplicados em dentina desmineralizada e saturada com etanol e a interface produzida por adesivos hidrofílicos aplicados em dentina desmineralizada e saturada com água. Além disso, este estudo também mostrou que a morfologia da interface adesiva formada não diferiu entre as diferentes técnicas utilizadas (390).

Assim, apesar dos avanços alcançados e descritos no texto até hoje em relação aos sistemas adesivos, ainda há muito o que fazer na busca por uma interface adesiva que possua durabilidade e resistência ao longo do tempo.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo são:

- Obter e caracterizar nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas.
- Avaliar possíveis benefícios da utilização de nanopartículas de hidroxiapatita durante o processo adesivo em dentina como uma proposta inovadora no aumento da durabilidade destas restaurações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O capítulo de material e métodos foi dividido em duas partes síntese e caracterização das partículas funcionalizadas e interação da partícula de hidroxiapatita nanoparticulada modificada por ácido deoxicólico em dentina bovina.

4.1 Síntese de Hidroxiapatita

As amostras de hidroxiapatita foram sintetizadas pelo método de precipitação em solução aquosa. Mediante este método, foram utilizadas duas soluções aquosas, uma solução de nitrato de cálcio (Synth - Brasil), 0,1M e outra solução de fosfato de amônio dibásico (Synth – Brasil), 0,06M, ambas preparadas com água Milli-Q (Milipore) e ajustadas para o pH 9 pela adição de NH_4OH . Em um balão volumétrico, sob agitação inicial de aproximadamente 600 rpm, foi adicionada primeiramente a solução de nitrato de cálcio e em seguida a de fosfato de amônio dibásico. Uma solução concentrada (30%) de hidróxido de amônio (Synth - Brasil) foi gotejada ajustando o pH durante a síntese, a fim de mantê-lo em um valor em torno de nove. A mistura final passou por um tratamento térmico a aproximadamente 95°C durante 8 horas, que implicou em uma reprecipitação dos cristais fazendo com que estes tenham uma cristalinidade maior. Durante as 8 horas a mistura foi mantida em um sistema com condensador e um agitador magnético com aquecimento (Corning PC-420 D), conforme a Figura 4.1, garantindo que a solução entrasse em refluxo. Após o tratamento térmico, foi realizada a lavagem e separação do precipitado, através da ressuspensão em água Milli-Q em banho ultrassônico e centrifugação a 1280 g durante 3 minutos (Heraeus- Sepatech – Labofuge A), após cada lavagem (conforme Figura 4.2). O sólido foi então seco em liofilizador (Benchtop – Virtis) (Figura 4.3) por 24 horas e desagregado em um moinho de bolas (Retsch®

modelo MM 400) (Figura 4.4), obtendo-se assim a hidroxiapatita nanoparticulada.

Figura 4.1- Solução durante a síntese, mantida sob um sistema com condensador e agitador magnético com aquecimento

Figura 4.2- Esquema mostrando o passo-a-passo da lavagem e filtragem da solução. Após cada centrifugação, descarta-se o sobrenadante e ressuspende o precipitado em água Milli-Q com auxílio do banho ultrassônico, e acrescentando o restante da solução. Até que toda solução tenha sido filtrada

Figura 4.3- Liofilizador utilizado para secagem das amostras sintetizadas de hidroxiapatita

Figura 4.4- Moinho de bolas utilizado para desagregação das amostras de hidroxiapatita sintetizadas

4.2 Adição de ligantes

Foram sintetizados três tipos de hidroxiapatita nano particulada:

- 1 – hidroxiapatita pura
- 2 – hidroxiapatita funcionalizada com ácido abiético
- 3 – hidroxiapatita funcionalizada com ácido deoxicólico

A adição dos ligantes ácido abiético (AB) e ácido deoxicólico (AD) durante a síntese das nanopartículas, cujas fórmulas estruturais estão representadas na Figura 4.5 e Figura 4.6, respectivamente, teve como objetivo controlar o crescimento dos cristais, modificando não só o tamanho como também o formato destes cristais. Além disso, a adição de ligantes modifica a superfície dos nanocristais de HA possibilitando o controle das interações destes com as fibras colágenas.

Todas as amostras de HA foram sintetizadas conforme o método descrito anteriormente no item 4.1. Nas amostras funcionalizadas com os ligantes, a HA foi sintetizada utilizando-se o mesmo método descrito, sendo que houve a adição do ligante na solução de fosfato de amônio dibásico. Tanto o ácido abiético como o deoxicólico possuem grupos carboxilatos que se adicionados na solução de cálcio, levaria a formação do respectivo sal insolúvel, influenciando a formação da HA.

Figura 4.5- Fórmula estrutural do ácido abiético

Figura 4.6- Fórmula estrutural do ácido deoxicólico

4.3 Caracterização das hidroxiapatitas sintetizadas

A caracterização do material sintetizado tem como finalidade verificar a formação das nanopartículas de hidroxiapatita e garantir as propriedades do biomaterial. Todo biomaterial antes de ser implantado deve ser caracterizado para que haja a comprovação de sua natureza e propriedades (90). Além disso, qualquer hidroxiapatita sintetizada, comercialmente ou não, deve ser caracterizada quanto às fases cristalinas presentes antes de ser utilizada para fins específicos. Um exemplo que mostra a necessidade do conhecimento das fases cristalinas é que condições de síntese acima de 800°C geralmente

originam uma mistura de beta tricálcio fosfato (β -TCP) e HA. Mas, o β -TCP apresenta como desvantagem a baixa resistência mecânica, restringindo a sua utilização em regiões que requeiram altos esforços mecânicos (391).

4.3.1 Espectroscopia por dispersão de raio X

A espectroscopia por dispersão de raio X (EDX) permite avaliar a composição elementar do material que está sendo analisada, e a relação entre as porcentagens relativa dos mesmos, de forma qualitativa ou quantitativa. No aparelho existe uma fonte de raios-X que emite uma radiação sobre a amostra, atingindo seus átomos e fazendo com que os elétrons presentes em suas camadas eletrônicas menos energéticas (mais próximas ao núcleo do átomos) sejam excitados para as camadas eletrônicas mais externas, por exemplo da camada K para L ou da L para a M (Figura 4.7). Um detector, captura a energia emitida pelos elétrons excitados ao retornarem ao seu estado fundamental, sendo esta energia relativa ao conteúdo das partículas interatômicas, principalmente prótons, de cada átomo. Isto permite distinguir cada tipo de átomo constituinte da amostra, sendo a intensidade do sinal proporcional a sua concentração. Levando em consideração a tabela periódica (Figura 4.9), podemos dizer que esta técnica consegue detectar os elementos dos grupos de 1 a 18, a partir do período 3. No caso de uma amostra de hidroxiapatita, o aparelho consegue detectar e quantificar a presença de cálcio e fósforo, já que o oxigênio, hidrogênio ou carbono presente nos ligantes não são detectados.

Figura 4.7- Esquema ilustrando o que acontece quando a amostra é atingida pela radiação. Os símbolos em verde indicam os prótons, Os símbolos em amarelo, no interior do núcleo, representam os nêutrons, e os elétrons estão representados em esferas azuis. As letras K, L, M e N em azul representam as camadas eletrônicas

Figura 4.8- Esquema mostrando como ocorre a detecção do sinal de intensidade de energia no EDX

1																		18																	
IA																		VIIIA																	
1	1 H Hidrogênio 1,008		2 He Hélio 4,003																2 He Hélio 4,003																
2	3 Li Lítio 6,941		4 Be Berílio 9,012																10 Ne Neônio 20,18																
3	11 Na Sódio 22,99		12 Mg Magnésio 24,31																18 Ar Argônio 39,95																
4	19 K Potássio 39,10		20 Ca Cálcio 40,08																36 Kr Criptônio 83,80																
5	37 Rb Rubídio 85,47		38 Sr Estrôncio 87,62																86 Rn Radônio (222)																
6	55 Cs Césio 132,91		56 Ba Bário 137,33																86 Rn Radônio (222)																
7	87 Fr Frâncio (223)		88 Ra Rádio 226,03																86 Rn Radônio (222)																
1																		18																	
IA																		VIIIA																	
1	1 H Hidrogênio 1,008		2 He Hélio 4,003																2 He Hélio 4,003																
2	3 Li Lítio 6,941		4 Be Berílio 9,012																10 Ne Neônio 20,18																
3	11 Na Sódio 22,99		12 Mg Magnésio 24,31																18 Ar Argônio 39,95																
4	19 K Potássio 39,10		20 Ca Cálcio 40,08																36 Kr Criptônio 83,80																
5	37 Rb Rubídio 85,47		38 Sr Estrôncio 87,62																86 Rn Radônio (222)																
6	55 Cs Césio 132,91		56 Ba Bário 137,33																86 Rn Radônio (222)																
7	87 Fr Frâncio (223)		88 Ra Rádio 226,03																86 Rn Radônio (222)																
1																		18																	
IA																		VIIIA																	
1	1 H Hidrogênio 1,008		2 He Hélio 4,003																2 He Hélio 4,003																
2	3 Li Lítio 6,941		4 Be Berílio 9,012																10 Ne Neônio 20,18																
3	11 Na Sódio 22,99		12 Mg Magnésio 24,31																18 Ar Argônio 39,95																
4	19 K Potássio 39,10		20 Ca Cálcio 40,08																36 Kr Criptônio 83,80																
5	37 Rb Rubídio 85,47		38 Sr Estrôncio 87,62																86 Rn Radônio (222)																
6	55 Cs Césio 132,91		56 Ba Bário 137,33																86 Rn Radônio (222)																
7	87 Fr Frâncio (223)		88 Ra Rádio 226,03																86 Rn Radônio (222)																

Figura 4.9- Tabela periódica mostrando em vermelho o que o aparelho não consegue detectar, em verde o que ele detecta e em amarelo a detecção é possível, mas não de maneira precisa

A análise de EDX foi realizada no aparelho EDX-720 da Shimadzu (Figura 4.10).

Figura 4.10- Aparelho utilizado para a análise de EDX

Para a realização desta análise, foram confeccionadas pastilhas com os pós de hidroxiapatita. Os pós de hidroxiapatita sintetizados foram primeiramente macerados, junto com ácido bórico (HBO_3) (Synth – Brasil) em pó, com o auxílio de um almofariz e pistilo, com o objetivo de deixar o pó mais homogêneo possível (Figura 4.11). A proporção utilizada de hidroxiapatita e ácido bórico estão no Quadro 4.1. Após o maceramento, as amostras foram prensadas em um pastilhador (Figura 4.12 e Figura 4.13) para a então obtenção das pastilhas.

Figura 4.11- Maceramento dos pós de hidroxiapatita

Quadro 4.1- Tabela mostrando a proporção de hidroxiapatita e ácido bórico utilizada para confecção das pastilhas

	Pó de Hidroxiapatita (mg)	HBO ₃ (mg)	Massa Final da pastilha (mg)
Hap PURA	10	290	300
Hap. Ac. Abiético	10	290	300
Hap Ac. Deoxicólico	10	290	300

Figura 4.12- Pastilhador utilizado para prensar as amostras durante a produção das pastilhas para análise de EDX

Figura 4.13- O dispositivo já com o pó de hidroxiapatita sendo prensado sob um sistema á vácuo, durante a confecção das pastilhas

Depois de obtidas, as pastilhas foram colocadas em um suporte de amostra como representado na Figura 4.14, para então realização da leitura no EDX.

Figura 4.14- Suporte utilizado para colocar as pastilhas durante a leitura

4.3.2 Difractometria de Raio x

A análise de estruturas cristalinas por difratometria de raio x é de grande importância para a identificação e obtenção de características estruturais deste composto cristalino. Nesta análise, o difratômetro incide um feixe de raios x de comprimento de onda determinado, ocorre a penetração dos raios na rede cristalina, interação destes raios com os átomos que compõe o cristal, e a partir disso, tem-se várias difrações. O detector então capta os raios difratados, traçando o desenho da rede cristalina, através das medidas dos ângulos de difração dos raios emergentes (θ), elucidando a distância entre os planos da rede cristalina e consequentemente sua estrutura (Figura 4.15).

Figura 4.15- Esquema de como ocorre a difração de raios x

Os pós de hidroxiapatita sintetizados foram macerados, assim como já descrito anteriormente na metodologia referente à análise de EDX, porém, sem a adição de HBO_3 . Os pós foram então enviados à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo para realização da análise de DRX.

4.3.3 Espalhamento de Luz Dinâmica

A análise de espalhamento de luz dinâmica (DLS) tem como objetivo, medir o perfil de tamanho das partículas através da velocidade de movimentação destas em dispersão. Esta análise é muito utilizada em partículas submicrométricas, e através dela podemos obter as medidas para determinar a distribuição média de tamanhos das nanopartículas que foram sintetizadas.

Esta análise leva em consideração o conceito do “Movimento Browniano”, ou seja, de que partículas em suspensão se movem aleatoriamente, e este movimento aleatório de pequenas partículas é uma consequência dos choques das moléculas do fluido nas partículas. Se a temperatura é a mesma, partículas maiores se movem mais lentamente quando comparadas a partículas menores. E de acordo com a Teoria Cinética Molecular de Einstein, moléculas que são muito menores que as partículas são capazes de mudar a direção e velocidade destas partículas, por exemplo, as moléculas de água possuem $0,00033 \mu\text{m}$ e, portanto podem mover partículas maiores que elas. Quando uma fonte coerente de luz, com frequência conhecida, como a luz laser, é incidida sobre partículas em movimento, ela é espalhada em todas as direções pelas partículas, e em frequência diferente. E esta mudança de frequência é chamada de Efeito Doppler. Através desta mudança de frequência na luz que se consegue relacionar o tamanho das partículas. As partículas menores possuem uma velocidade média maior, e, portanto, há uma maior mudança na frequência da luz espalhada quando comparada a partículas maiores. Esta diferença que é utilizada para relacionar e montar um histograma de distribuição de tamanho de uma amostra de partículas.

Para a realização desta análise, foram pesados 30mg de cada tipo de pó de hidroxiapatita. A este pó foi adicionado 30ml de etanol (solução de 1mg/ml). A solução foi levada então a um ultrassom microprocessado de alta intensidade (750W) com controle de temperatura modelo VC750, marca Sonics (Newtown, CT, USA) por 2 minutos e a uma potência de 18%. As amostras foram então levadas para análise de DLS no aparelho modelo Nanotrak-252 da Microtrac (Figura 4.16). O equipamento é composto por um laser de estado sólido que emite uma luz monocromática que atravessa um porta amostra de quartzo. A luz é então espalhada em todas direções pelas partículas em solução. Os fótons espalhados são coletados por uma pequena lente que transmite a um fotodiodo por meio de uma fibra ótica. Os fótons são detectados e se faz uma autocorrelação com a posição das partículas e a mudança na frequência dos fótons incididos e os espalhados, em um determinado intervalo de tempo.

Figura 4.16- Aparelho de DLS utilizado. Onde em C conseguimos observar em maior aumento a sonda colocada em contato com a solução para realização da análise

4.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizadas com o intuito de observar a morfologia e determinar as dimensões das hidroxiapatitas sintetizadas.

As amostras de nanopartículas de hidroxiapatita foram dispersas em álcool isopropílico a 1%, colocadas em uma cuba ultrassônica por 5 minutos, deixadas em repouso por 24 horas e gotejadas em tela de cobre de 200 mesh, cobertos com película de filme de carbono (Formvar).

Para obtenção das imagens as telas de cobre foram então analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010, operando com aceleração de voltagem de 80kv.

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do pós de hidroxiapatita sintetizados foram realizadas com o intuito de observar a morfologia das hidroxiapatitas sintetizadas.

As amostras utilizadas no estudo de microscopia foram preparadas de 2 maneiras distintas. As amostras observadas a 500x foram depositadas sobre os *stubs*, que estavam coberto com uma fita dupla-face e depositados sobre as amostras partículas de ouro. Já as amostras observadas a 7.500x, estas foram preparadas a partir de dispersões de 1g/L dos sólidos em etanol. Aproximadamente 5 μ L de cada uma das dispersões foram gotejados sobre substratos de silício previamente cortado (5 x 5 mm), deixando-se evaporar o solvente lentamente, em ambiente controlado e isento de poeira (23°C e 50% umidade relativa). Foi utilizado um microscópio eletrônico de

varredura Jeol 7401, operando em modo de elétrons secundários, com aceleração de voltagem de 5kv. Aumento de 75.000x (ambos na mesma escala).

4.3.6 Microscopia de Força Atômica

As imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram realizadas para se obter imagens tridimensionais das nanopartículas de hidroxiapatita. Além de formato e tamanho das amostras, o aparelho também informa dureza, rugosidade e temperatura.

A microscopia de força atômica (AFM ou SFM – Scanning Force Microscopy) faz parte de uma classe de microscopia denominada de microscopia de varredura por sonda (Scanning Probe Microscopy – SPM). Dentro desta classe também se encontra a microscopia de varredura por tunelamento (STM – Scanning Tunneling Microscopy), sendo que esta se diferencia da AFM pelo tipo de interação monitorada entre a sonda e a amostra, porém ambas possuem o mesmo aparato técnico instrumental. Existem várias forças de interação entre sonda-amostra, e dependendo do regime de forças envolvido, repulsiva ou atrativa, existem 3 modos de operação para o AFM, modo de contato, quando o regime envolve forças repulsivas, modo de não-contato, quando as forças são atrativas, e modo intermitente, quando as medidas são realizadas através da inversão no tempo entre os regimes repulsivo e atrativo. Uma das grandes vantagens do SPM quando comparado com outros tipos de microscopias como a eletrônica de transmissão e a eletrônica de varredura, está no fato de que esta pode ser utilizada com amostras em condições ambientes, sem a necessidade do emprego do vácuo, tanto em ar como em solução. Quando comparadas ao STM, a técnica de AFM ainda possui vantagens como melhor resolução e possibilidade de emprego em amostras não condutoras.

Um microscópio do tipo SPM é composto basicamente por um sistema de varredura, um sistema de detecção de interação entre a sonda e a amostra, e

pela sonda. O aparelho de AFM é composto, mais especificamente, por um cantilever (conjunto haste e sonda), scanner (sistema de varredura), um laser de diodo, um fotodetector e um controlador eletrônico (sistema de feedback). O cantilever é utilizado na varredura e possui uma haste flexível que se comporta como uma mola (a constante de mola da haste serve para que não haja deformações na superfície da amostra). Na ponta do cantilever está a sonda em formato de prisma que possui átomos capazes de interagir com os átomos da amostra. Quando a sonda passa pela amostra o conjunto haste-sonda sofre uma deformação em função da força entre os átomos da ponta da sonda e os átomos desta amostra. Esta força vai depender da distância entre os átomos da amostra, ou seja, quanto mais distantes estão os átomos da amostra, menor a força atômica que a sonda deve fazer. Há um feixe de luz laser que é incidido sobre a haste do cantilever, assim que ocorrer uma deformação no cantilever, causada pela diferença de forças, há uma oscilação de amplitude da luz laser refletida sobre o sensor óptico (fotodiodo) que equipa o microscópio e são estas variações de deflexão do feixe de luz laser que serão captadas pelo fotodiodo e utilizadas pelo computador não só para construção da imagem tridimensional da superfície da amostra como também para controlar o scanner durante a varredura. A sonda em um microscópio de AFM, operando sob o modo de força constante, é deslocada sobre a superfície da amostra com o auxílio de um scanner que, por sua vez, está acoplado a um controlador eletrônico. Durante o deslocamento da sonda sobre a amostra ocorrem variações na interação sonda-amostra, e estas variações são detectadas por um fotodetector, através das variações de deflexão de um feixe de laser incidente na extremidade do cantilever. Quando se opera sob o modo de força constante, a deflexão monitorada deve se manter constante durante a varredura, de forma a manter constante a interação entre a sonda e a amostra, ou seja, a força. Para isto, um controlador eletrônico, através de um sistema de feedback mantém a força constante, deslocando o scanner na direção Z de forma a manter constante a deflexão a cada ponto (X,Y) da imagem. Através dos dados armazenados a cada ponto da superfície (X,Y), e associados ao deslocamento Z, dão origem a topografia da amostra (Figura 4.17) (155). Analogicamente, o AFM se assemelha a leitura em Braille por um cego, onde a luz não é captada diretamente, mas através do tato dos dedos em contato com as letras, a informação é enviada ao

cérebro. No microscópio de força atômica também não existe lentes que focalizam a luz.

Figura 4.17- Figura mostrando os componentes do microscópio de força atômica

Para realização da análise de AFM, as amostras foram dispersas em etanol, e 5 μl desta suspensão de nanopartículas foi gotejada sobre uma superfície plana atômica, no caso utilizamos superfície de mica recém clivada (Ted Pella Inc.), deixando-se evaporar o solvente à temperatura ambiente em uma câmara de fluxo laminar (Figura 4.18).

Figura 4.18- Amostras das nanopartículas de hidroxiapatita em suspensão de etanol depositadas sobre superfície de mica para realização da análise de AFM

As amostras foram então levadas ao microscópio de força atômica para realização das imagens. As medidas de AFM foram obtidas em microscópio modelo PicoSPM I (Molecular Imaging) com controlador PicoScan 2100 (Molecular Imaging) acoplado ao controlador MAC Mode (Molecular Imaging). Na aquisição das imagens topográficas foi utilizado PicoScan (Molecular Imaging) operando nos modos AFM de contato intermitente, denominado MAC Mode. Neste caso foram utilizados cantilevers MAC Levers Tipo II (Molecular Imaging, cantilever com revestimento magnético em sua parte superior), com constante elástica, $k \sim 2,8 \text{ N/m}$ e frequência de ressonância nominal, $f \sim 60 \text{ kHz}$, operando em condições ambiente com velocidade de varredura entre 0,5 e 1 Hz e 256 a 512 pontos por linha (Figura 4.19).

Figura 4.19- A figura mostra o microscópio de força atômica utilizado. E em maior aumento a região onde a amostra é colocada

4.4 Interação da hidroxiapatita sintetizada e as fibras colágenas expostas da dentina

Depois de sintetizadas, as hidroxiapatitas nanoparticuladas foram aplicadas sobre a dentina exposta de incisivos bovinos para observação da interação destas com as fibras colágenas. Para a análise desta interação foram realizadas: Microscopia Confocal Raman, teste mecânico de Cisalhamento, análise de envelhecimento das amostras através da Termociclagem.

4.4.1 Microscopia Confocal Raman

Para observar o efeito da aplicação das hidroxiapatitas nanoparticuladas sintetizadas, sobre as fibras colágenas expostas após o ataque da dentina com ácido fosfórico, foi utilizado um microscópio confocal Raman a fim de detectar a presença da hidroxiapatita na dentina comparado com um dente controle onde o ataque ácido foi realizado (sofreu desmineralização), porém não foi aplicada hidroxiapatita.

4.4.1.1 mecanismo de funcionamento do microscópio confocal Raman

Para entender o princípio de funcionamento de um microscópio confocal Raman, é importante entender os conceitos de espectroscopia Raman e o de confocalidade.

A espectroscopia Raman é uma técnica de alta resolução que fornece em um curto intervalo de tempo informações químicas e estruturais de quase qualquer composto inorgânico ou orgânico presente na amostra, permitindo assim a sua identificação. Ela é baseada no efeito Raman ou espalhamento Raman, que é o espalhamento inelástico de um fóton. Quando um feixe de luz monocromático incide sobre uma amostra, os fótons que compõe esta radiação podem ser transmitidos, absorvidos ou espalhados pelos átomos que compõem a amostra.

Quando os fótons são espalhados a partir de uma molécula, a maioria dos fótons são elasticamente espalhados (espalhamento Rayleigh), de tal modo que os fótons espalhados possuem a mesma frequência e comprimento de onda da radiação incidente. No entanto, uma pequena porção dos fótons espalhados são dispersos tendo uma frequência diferente, e geralmente menor do que, a dos fótons incidentes. A análise mediante espectroscopia Raman se baseia na

análise da luz espalhada inelasticamente pela amostra, onde uma pequena porção da luz é espalhada inelasticamente, sofrendo ligeiras mudanças de frequência devido a características do material a ser analisado e independente da frequência da luz incidente.

E o espalhamento inelástico pode ser denominado de Stokes ou anti-Stokes dependendo da diferença de energia do fóton incidido com o fóton espalhado pelo átomo da amostra (Figura 4.20).

Figura 4.20- Esquema mostra os tipos de espalhamentos que podem ocorrer ao incidir uma molécula com um fóton de energia $h\nu_0$ (Figura adaptada do livro Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho autor Oswaldo Sala)

Em um espectrômetro Raman, é identificada a energia da radiação espalhada inelasticamente, e é registrado cada componente espectral (referente a cada molécula diferente que compõe a amostra) e respectiva intensidade em um gráfico denominado espectro Raman. No espalhamento Raman do tipo Stokes, a molécula analisada se encontra em seu estado fundamental de menor energia, ao sofrer colisão com o fóton da radiação incidente de energia $h\nu_0$, passa para um estado intermediário, e decai em seguida para um estado vibracional de energia e_v . O fóton espalhado neste caso possui energia menor do que a incidente ($h\nu_0 - e_v$). No espalhamento Rayleigh, após a interação do fóton com a molécula, esta volta ao mesmo estado de energia inicial, e, portanto, não há modificação de frequência do fóton incidido para o espalhado. Apesar da maioria das substâncias encontrarem-se em um nível vibracional de menor energia, sabe-se pela lei da distribuição de Boltzmann que níveis de maior

energia podem estar também populados, dependendo de sua energia e da temperatura. Por isso, a radiação espalhada inelasticamente pode ter energia maior que a incidente, sendo denominada de anti-Stokes. No espalhamento Raman do tipo anti-Stokes, o fóton incidente encontra a molécula já num estado excitado e após a interação molécula-fóton incidente, a molécula decai para o estado fundamental. E devido a esta diferença de energia, o fóton é espalhado com uma energia $h\nu_0 + e_v$. Por isso o espalhamento inelástico anti-Sokes leva a um espectro de menor intensidade quando comparado ao Stokes.

O espectrofotômetro Raman pode estar associado a um microscópio óptico, e desta forma teremos a microscopia Raman. Mas, quando associado a um microscópio confocal, temos o Microscópio Confocal Raman. O microscópio Confocal Raman é um microscópio óptico onde a amostra é iluminada com uma fonte de luz pontual e monocromática (laser), e a imagem deste ponto é detectada através de um *pinhole* na frente do detector. Como o *pinhole* está localizado no plano focal do microscópio, o *pinhole* está confocal com o ponto de iluminação, ou seja, a fonte de iluminação e o *pinhole* estão posicionados no mesmo plano focal. E como o sinal é detectado através do *pinhole*, apenas a luz originada do plano focal consegue atingir o detector. A luz emitida abaixo ou acima do plano focal não está no foco do plano do *pinhole* e, portanto não contribuirá para a imagem que será obtida (Figura 4.21).

A grande vantagem do microscópio confocal para o convencional é, portanto o aumento no contraste da imagem microscópica e boa resolução em profundidade, ou seja, possibilidade de grande definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal, e tudo isto, devido à supressão de luz difusa. Outra vantagem é que como o princípio de detecção do microscópio confocal limita a detecção de luz para o plano focal também possibilita a análise de amostras transparentes em 3D e um corte óptico da amostra pode ser feito sem cortar a amostra ao meio.

Porém, ao juntarmos o efeito Raman com a confocalidade, não podemos esquecer que a Espectroscopia Raman é uma técnica de sinal fraco, onde 1 entre 10^8 de fótons excitadores dá origem a um único fóton Raman. E, portanto, em Microscopia Confocal Raman, a situação é ainda mais difícil, uma vez que o volume detectado é reduzido para um pequeno *pinhole*. Assim é necessário a

escolha de um bom espectrômetro e um bom planejamento da óptica de excitação e detecção.

O microscópio confocal Raman é composto basicamente por: laser, microscópio, espectrômetro com detector e um piezo-scanner (Figura 4.22).

Figura 4.21- Esquema mostrando o funcionamento do sistema óptico de um microscópio confocal (figura adaptada do livro *Confocal Raman Microscopy*, dos autores Thomas Dieing, Olaf Hollricher e Jan Toporski)

Figura 4.22- Microscópio Confocal Raman modelo alpha 300R da Witec (imagem da Witec)

Na análise por Microscópio Confocal Raman é gerado uma base com os espectros referente a cada ponto da amostra a ser analisada. E o conjunto de dados destes espectros gerados é utilizado para geração da imagem Raman.

A imagem Raman pode ser gerada de 3 formas diferentes dependendo da forma como for feita a varredura da minha amostra. No modo *point to point profile*, uma sequência de pontos são adquiridos separadamente, e o espectro completo de cada ponto é armazenado para posterior análise. No modo *line imaging*, o laser é focado em uma linha, e assim fornece os espectros dos diversos pontos ao longo da linha, mas faz isto simultaneamente ao invés de sequencial. E no *global imaging* ilumina-se uma área ampla, e coleta um espectro da área inteira iluminada.

4.4.1.2 preparo das amostras para análise da interface adesiva em microscópio confocal Raman

Foi realizada esta análise com o objetivo de verificar a influência da aplicação da hidroxiapatita, modificada por ácido deoxicólico, na camada híbrida

formada tanto 24 horas após a realização do procedimento adesivo como também após a exposição dos espécimes à ciclagem térmica.

Foram utilizados 4 incisivos bovinos sem as raízes. As raízes foram seccionadas na região da linha amelocementária, utilizando um disco de corte diamantado (Diamond Wafering Blades 1/2"- série 15 HC - EXTEC Corp. Enfield, CT, USA) em uma máquina de corte Isomet 1000 (Buheler, Lake Bluff, IL, EUA).

Cada um dos incisivos foram levados, primeiramente, à máquina politriz Buehler (EcoMet 3000) para o desgaste da porção de esmalte e assim exposição da dentina. Foram utilizados inicialmente lixas de carbetto de silício com granulação 180 (até o início da exposição) e posteriormente lixas com granulação 400 até a exposição total. Depois de exposta a dentina e antes da realização do procedimento adesivo, todos os espécimes foram polidos com lixa de carbetto de silício de granulação 600 por 1 minuto, sob-refrigeração, para criação de uma camada de esfregaço (392).

Os procedimentos adesivos foram então realizados conforme o grupo que cada dente pertencia. Um dente era do grupo controle e o outro do grupo deoxicólico.

No dente do grupo controle o procedimento adesivo foi realizado conforme protocolo padrão já bem estabelecido na literatura e clinicamente, ou seja, da seguinte forma:

- aplicação do ácido fosfórico 37% por 15 segundos
- lavagem com jato de ar e água por 30 segundos
- remoção do excesso de água com papel absorvente deixando a superfície de dentina levemente úmida
- aplicação do *primer* (3M ESPE Adper Scotchbond) sob agitação por 30 segundos e leve jato de ar para remover o excesso (deixando um aspecto final levemente úmido)
- aplicação do adesivo *bond* (3M ESPE Adper Scotchbond) sob agitação por 30 segundos e secar levemente para homogeneizar a espessura de adesivo
- fotopolimerização por 20 segundos com o fotopolimerizador Radii Plus (SDI)
- aplicação da resina composta ICE (SDI) em toda a superfície de dentina do dente incisivo
- fotopolimerização por 40 segundos

No dente do grupo deoxicolico o procedimento adesivo foi realizado da seguinte forma:

- aplicação do ácido fosfórico 37% por 15 segundos
- lavagem com jato de ar e água por 30 segundos
- remoção do excesso de água com papel absorvente deixando a superfície de dentina levemente úmida
- preparação de uma suspensão de hidroxiapatita modificada por ácido deoxicolico (HA-DEO) à 1% em água Milli-Q
- aplicação da suspensão de HA-DEO pincelando (fazendo movimentos de vai e vem), com um microbrush, durante 30 segundos deixando em repouso por 10 segundos
- aplicação de etanol 50%, com um microbrush, agitando durante 10 segundos e deixando em repouso por mais 10
- aplicação do *primer* (3M ESPE Adper Scotchbond) sob agitação por 30 segundos e leve jato de ar para remover o excesso (deixando um aspecto final levemente úmido)
- aplicação do adesivo *bond* (3M ESPE Adper Scotchbond) sob agitação por 30 segundos e secar levemente para homogeneizar a espessura de adesivo
- fotopolimerização por 20 segundos com o fotopolimerizador Radii Plus (SDI)
- aplicação da resina composta ICE (SDI) em toda a superfície de dentina exposta do dente incisivo
- fotopolimerização por 40 segundos

Após o término da realização dos procedimentos adesivos, os espécimes foram mantidos em água destilada e estufa à 37°C durante 24 horas.

Os incisivos foram então submetidos a um corte único no sentido longitudinal, a fim de expor a interface adesiva. Para a realização dos cortes foi utilizado um disco de corte diamantado (Diamond Wafering Blades 1/2"- série 15 HC - EXTEC Corp. Enfield, CT, USA) em uma máquina de corte Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Os cortes foram realizados em baixa velocidade (150 rpm) e sob refrigeração com água.

As metades obtidas após o corte foram embutidas em resina acrílica quimicamente ativada JET (Clássico Artigos Odontológicos Ltda, São Paulo – SP, Brasil), com o auxílio de um dispositivo de silicone de condensação (Figura

4.23). Não foi utilizado tubo de PVC pois no experimento piloto realizado constatou que o tubo de PVC contribuía para trinca na interface adesiva, já que a resina acrílica se adere fortemente ao plástico do tubo. Antes de serem embutidos, as metades dos dentes foram fixadas em fita dupla face, sobre uma placa de vidro, com a face que será analisada no microscópio voltada para baixo, ou seja, o lado cortado voltado para baixo, a fim de garantir que a região pulpar ficasse do lado externo da resina acrílica de embutimento, e possibilitando assim a visualização da interface adesiva. Após o embutimento os espécimes foram levados a uma politriz para realização do polimento da face que será analisada em microscópio. Foi utilizada a politriz Buehler (Automet 250) conforme os parâmetros mostrados na Figura 4.24.

Figura 4.23- Dispositivo de silicone de condensação utilizado para o embutimento das metades dos dentes em resina acrílica

Figura 4.24- Politriz utilizada para o polimento das amostras. A imagem à direita mostra os parâmetros utilizados

Para o polimento foi utilizada lixas de carbeto de silício de diferentes granulações, respeitando a seguinte sequência: 400 – 1200 – 1500 – 2000.

Após o polimento os espécimes foram então fixados sobre uma lâmina de microscopia com o auxílio de massa de modelar e um dispositivo (Figura 4.25). A massa de modelar é colocada entre a lâmina e a base do espécime. O objetivo disto é nivelar a amostra, deixando a área de leitura do corpo de prova plana e paralela à superfície, requisito necessário para análise em Microscópio Confocal Raman.

Figura 4.25- Dispositivo para deixar a área de leitura do corpo de prova plana e paralela à superfície

Na Figura 4.26 podemos observar os espécimes prontos para serem analisados.

Figura 4.26- Espécimes após embutimento, polimento e nivelamento. Prontos para serem analisados em Microscópio Confocal Raman. C1 e C2 indicam o dente do grupo controle e D1 e D2 do grupo deoxicólico. A massa verde embaixo dos espécimes é a massa de modelar utilizada para o nivelamento

Os espécimes foram então analisados no Microscópio Confocal Raman para obter a leitura inicial. Após a realização da leitura inicial e obtenção das imagens Raman iniciais, os espécimes foram submetidos à ciclagem térmica (descrita no item 4.4.3). Após a ciclagem térmica os espécimes foram novamente fixados à lâmina de microscopia e submetidos à leitura em Microscópio Confocal Raman para a obtenção das imagens Raman após a termociclagem.

4.4.2 Cisalhamento

O teste de cisalhamento foi realizado a fim de analisar a influência da aplicação das hidroxiapatitas sintetizadas na resistência de união imediata da dentina à resina composta. Levando em consideração os resultados obtidos na análise de microscopia confocal Raman, optamos por escolher testar mecanicamente apenas a hidroxiapatita modificada por ácido deoxicólico.

a) Preparo dos espécimes para realização do teste de cisalhamento

Os incisivos bovinos foram primeiramente seccionados com um disco de corte diamantado (Diamond Wafering Blades 1/2"- série 15 HC - EXTEC Corp. Enfield, CT, USA) em uma máquina de corte Isomet 1000 (Buheler, Lake Bluff, IL, EUA), obtendo no final quadrados de 6 mm X 6 mm, conforme mostra o esquema da Figura 4.27.

Figura 4.27- O esquema acima mostra a sequência de cortes realizados nos incisivos bovinos até a obtenção de quadrados com a dimensão de 6 mm X 6 mm

Após o corte, os quadrados de incisivos bovinos foram embutidos em resina acrílica quimicamente ativada JET (Clássico Artigos Odontológicos Ltda, São Paulo – SP, Brasil), com o auxílio de um tubo de PVC cortado a uma altura de 12mm. Antes de serem embutidos, os quadrados foram fixados em cera 7 (Clássico Artigos Odontológicos Ltda, São Paulo – SP, Brasil) a fim de garantir que a porção de esmalte ficasse do lado externo da resina acrílica de embutimento, e assim facilitar o processo de exposição da dentina, como mostra a Figura 4.28.

Figura 4.28- A figura mostra a fixação prévia em cera 7 dos quadrados de incisivo cortados e o processo de embutimento dos dentes em resina acrílica com auxílio de um tubo de PVC

Após o processo de embutimento, os espécimes foram levados à máquina politriz Buehler (EcoMet 3000) para o desgaste da porção de esmalte e assim exposição da dentina. Foram utilizados inicialmente lixas de carbeto de silício com granulação 180 (até o início da exposição) e posteriormente lixas com granulação 400 até a exposição total. Depois de exposta a dentina e antes da realização do procedimento adesivo, todos os espécimes foram polidos com lixa de carbeto de silício de granulação 600 por 1 minuto, sob-refrigeração, para criação de uma camada de esfregaço (392). Os espécimes foram então divididos em grupos controle, deoxicólico, controle TC (termociclado) e deoxicólico TC, conforme mostra a Quadro 4.2.

Nos grupos controle e controle TC o procedimento adesivo foi realizado conforme protocolo padrão já bem estabelecido na literatura e clinicamente, ou seja, da seguinte forma (Figura 4.29):

- aplicação do ácido fosfórico 37% por 15 segundos
- lavagem com jato de ar e água por 30 segundos
- remoção do excesso de água com papel absorvente deixando a superfície de dentina levemente úmida
- aplicação do *primer* (3M ESPE *Adper Scotchbond*) sob agitação por 30 segundos e leve jato de ar para remover o excesso (deixando um aspecto final levemente úmido)
- aplicação do adesivo *bond* (3M ESPE *Adper Scotchbond*) sob agitação por 30 segundos e secar levemente para homogeneizar a espessura de adesivo
- fotopolimerização por 20 segundos com o fotopolimerizador Radii Plus (SDI)
- aplicação da resina composta ICE (SDI) com o auxílio de um dispositivo para cisalhamento da Ultradent (Figura 4.30)
- fotopolimerização por 40 segundos

Figura 4.29- Passo a passo do procedimento adesivo realizado nos grupos controle

Figura 4.30- Dipositivo da Ultradent utilizado para confecção dos espécimes para o teste de cisalhamento

Nos grupos deoxicolico e deoxicolico TC o procedimento adesivo foi realizado da seguinte forma (Figura 4.31):

- aplicação do ácido fosfórico 37% por 15 segundos
- lavagem com jato de ar e água por 30 segundos
- remoção do excesso de água com papel absorvente deixando a superfície de dentina levemente úmida
- preparação de uma suspensão de hidroxiapatita modificada por ácido deoxicolico (HA-DEO) à 1% em água Milli-Q
- aplicação da suspensão de HA-DEO pincelando (fazendo movimentos de vai e vem), com um microbrush, durante 30 segundos deixando em repouso por 10 segundos
- aplicação de etanol 50%, com um microbrush, agitando durante 10 segundos e deixando em repouso por mais 10.
- aplicação do *primer* (3M ESPE Adper Scotchbond) sob agitação por 30 segundos e leve jato de ar para remover o excesso (deixando um aspecto final levemente úmido)
- aplicação do adesivo *bond* (3M ESPE Adper Scotchbond) sob agitação por 30 segundos e secar levemente para homogeneizar a espessura de adesivo
- fotopolimerização por 20 segundos com o fotopolimerizador Radii Plus (SDI)
- aplicação da resina composta ICE (SDI) com o auxílio de um dispositivo para cisalhamento da Ultradent (Figura 4.30)

-fotopolimerização por 40 segundos

Figura 4.31- Passo a passo do procedimento adesivo realizado nos grupos deoxicólico (as imagens destacadas em vermelho são referentes aos passos que diferem do procedimento realizado nos grupos controle)

Após o término da realização do procedimento adesivo, os espécimes foram mantidos em água destilada e estufa à 37°C, e 24 horas depois foram submetidos ao teste de cisalhamento. Os espécimes dos grupos TC foram primeiramente submetidos à termociclagem, e apenas 24 horas após o término desta, os espécimes foram cisalhados.

O teste de cisalhamento foi realizado na máquina de ensaios universal Kratos (Kratos Dinamômetros, Brasil) utilizando a ponta ativa em cinzel, com velocidade de 1mm/min, até o momento da fratura. A carga de ruptura, fornecida em Newton (N) pela máquina, foi convertida em tensão de ruptura em Megapascal (MPa) através da divisão do valor da carga, pela área fixa do dispositivo de 4,33 mm²).

Quadro 4.2- Divisão dos grupos quanto ao tratamento prévio da dentina e a exposição à termociclagem. E o número de espécimes (n) em cada grupo

Grupos	Tratamento da dentina	Termociclagem	N
Controle (C)	-	-	15
Deoxicólico (DEO)	Aplicação da hidroxiapatita modificada por ácido deoxicólico e saturação com etanol 50%	-	15
Controle TC	-	10 000 ciclos	15
Deoxicólico TC (DEO TC)	Aplicação da hidroxiapatita modificada por ácido deoxicólico e saturação com etanol 50%	10 000 ciclos	15

4.4.3 Envelhecimento

Os espécimes dos grupos Controle TC e Deoxicólico TC foram submetidos à ciclagem térmica previamente ao teste de cisalhamento, com o intuito de observar a influência da aplicação da hidroxiapatita modificada por ácido deoxicólico na resistência de união mediata da dentina à resina composta.

Os mesmos espécimes utilizados para a obtenção das imagens Raman iniciais em Microscópio Confocal Raman foram submetidos à ciclagem térmica, a fim de analisar a interface adesiva e assim observar possíveis mudanças na morfologia da camada híbrida dos espécimes de ambos os grupos após a termociclagem.

Para a ciclagem térmica foi utilizada a máquina termocicladora da Figura 4.32. Os espécimes foram submetidos a 10 000 ciclos alternando, 30 segundos

em banho a 55°C e 30 segundos a 5°C, dispostos em uma cesta conforme mostra a Figura 4.33.

Figura 4.32- Máquina termocicladora utilizada para o teste de envelhecimento

Figura 4.33- Disposição dos espécimes na cesta para realização da ciclagem térmica

4.4.4 Análise estatística

Os dados obtidos no teste de cisalhamento foram submetidos ao teste de normalidade, análise de variância e teste de contraste de Tukey para verificar as diferenças entre os grupos utilizando o software Minitab 16 com nível de significância 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados estão divididos em: resultados da caracterização e resultados referentes a interação da partícula sintetizada em dentina bovina.

5.1 Caracterização das hidroxiapatitas sintetizadas

Para a caracterização das partículas utilizamos os métodos de espectroscopia por dispersão de raios x, difratometria de raio x, espalhamento de luz dinâmica, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica.

5.1.1 Espectroscopia por dispersão de raios X (EDX)

A análise de EDX traz como resultado um gráfico com o espectro indicando os elementos presentes na composição da amostra analisada e uma tabela indicando a análise quantitativa, ou seja a quantidade em porcentagem dos elementos presentes. Podemos observar os espectros das amostras sintetizadas (Figura 5.1, Figura 5.2 e Figura 5.3).

Por comparação podemos observar a presença do elemento cálcio e fósforo em todas as hidroxiapatitas sintetizadas (Figura 5.4).

Figura 5.1 - Espectros indicando a presença de cálcio e fósforo na amostra de hidroxiapatita sintetizada sem nenhum modificador de superfície (HAP). Intensidade em contagens por segundo versus energia em quilo elétron-volts

Figura 5.2 - Espectros indicando a presença de cálcio e fósforo na amostra de hidroxiapatita sintetizada com ácido abiético (AA). Intensidade em contagens por segundo versus energia em quilo elétron-volts

Figura 5.3 - Espectros indicando a presença de cálcio e fósforo na amostra de hidroxiapatita sintetizada com ácido deoxicólico (AD). Intensidade em contagens por segundo versus energia em quilo elétron-volts

Figura 5.4 - Comparação dos espectros indicando a presença dos elementos cálcio e fósforo nas 3 hidroxiapatitas sintetizadas (HA, AA e AD). A linha vermelha indica a detecção dos elementos fósforo em 2,21 keV e cálcio 3,89 keV em todas as amostras analisadas

Na Tabela 5.1 são apresentadas as porcentagens dos elementos detectados e a razão entre estas porcentagens. Nesta tabela podemos observar que a razão Ca/P são semelhantes entre as hidroxiapatitas sintetizadas, todas em torno de 2,0.

Tabela 5.1 - Porcentagens de cálcio e fósforo nas amostras de hidroxiapatita ABI (modificada por ácido abiético), DEO (modificada por ácido deoxicólico) e HAP (hidroxiapatita sintetizada sem modificadores). Porcentagens de cálcio e fósforo na curva padrão e a razão destas porcentagens

					%Ca/%P		
		ABI	DEO	HAP	ABI	DEO	HAP
%P direto do método do EDX	0,4	0,3	0,5		2,1	2,0	1,9
%Ca direto do método do EDX	0,8	0,6	1,0				
%P curva calculada	0,365	0,307	0,517		2,1	2,0	1,9
%Ca curva calculada	0,767	0,612	0,962				

5.1.2 Difractometria de Raio X (DRX)

Nos resultados de DRX obtêm-se um difratograma que indica através de picos o arranjo cristalino característico da amostra analisada (Figura 5.5). Em todas as amostras HA, AD e AA estão presentes os picos característicos de um cristal de hidroxiapatita (entre 20 e 60 2theta). A única diferença que podemos observar é a diminuição da intensidade e alargamento dos picos nas amostras de AD e AA, possivelmente indicando diminuição dos tamanhos dos cristalitos em comparação a HA.

Figura 5.5 - Comparação dos difratogramas obtidos pela análise de DRX das amostras de HA, AA e AD

5.1.3 Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS)

A análise por DLS fornece um gráfico com uma curva de Gauss indicando a distribuição de tamanho e o tamanho médio das partículas em suspensão da amostra analisada (Figura 5 .6, Figura 5 .7 e Figura 5 .8).

Figura 5.6 - Gráfico mostrando a distribuição de tamanho das partículas de HA

Figura 5.7 - Gráfico mostrando a distribuição de tamanho das partículas de AA

Figura 5.8 - Gráfico mostrando a distribuição de tamanho das partículas de AD

Analisando o resultado de DLS da partícula de HA sintetizada sem adição de ligantes, observamos no gráfico uma distribuição de tamanho homogênea apresentando tamanho médio de 37,8 nm. A adição de ácido abiético durante a síntese modificou o padrão de tamanho das partículas, mostrando uma distribuição mais heterogênea, ou seja partículas com tamanhos diferentes, onde 61,1% das partículas apresentam tamanho médio de 264,1 nm e 38,9% tamanho médio de 92,4 nm. Na Figura 5.8 observamos uma distribuição mais homogênea e semelhante à da Figura 5.6, mostrando que a adição de ácido deoxicólico resultou em partículas com distribuição de tamanho mais semelhante a hidroxiapatita sintetizada sem adição de ligantes. Porém as partículas apresentaram tamanho de 223 nm, ou seja houve um aumento no tamanho das partículas. No entanto, o DLS indica o tamanho das partículas em suspensão e em movimento, sem trazer informações sobre o grau de dispersão ou aglomeração das partículas, ou seja, o valor apresentado pode não representar o tamanho real das partículas constituintes, mas sim o tamanho de seu raio hidrodinâmico dos agregados. Assim, as partículas sintetizadas com ligantes apresentaram raio hidrodinâmico maior, contrastando com as informações obtidas por microscopia de transmissão, o que nos leva a concluir que provavelmente, com a adição de ligantes, houve o crescimento das partículas.

pela presença de aglomerados, devido a natureza mais hidrofóbica dos ligantes superficiais AA e AD, e consequentemente pior dispersão em água.

5.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Através da análise de MET dos pós podemos observar a morfologia das partículas de hidroxiapatita sintetizadas (Figura 5.9, Figura 5.10, Figura 5.11).

Figura 5.9 - Imagens de MET das partículas de HA

Na Figura 5.9 observamos que a partícula de HA possui um formato de bastonete com comprimento menor do que 200nm.

Figura 5.10 - Imagens de MET das partículas de AA

Na Figura 5.10 observamos que a partícula de AA possui tamanho e formato muito semelhante à partícula de HA.

Figura 5.11- Imagem de MET das partículas de AD

Na Figura 5.11 observamos que a partícula de AD possui também um formato de bastonete porém mais arredondado e menos longo, quando comparado com as partículas de AA e HA e com tamanho também menor do que 200nm.

5.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do pós de hidroxiapatita sintetizados podem ser observados nas figuras abaixo (Figura 5.12, Figura 5.13 e Figura 5.14).

Figura 5.12- Imagem de MEV do pó de HA sintetizada sem nenhum modificador. Aumento de 500x e 75000x

Na Figura 5.12 observamos o aglomerado de pó de HA. Observamos a grande tendência de aglomeração das partículas.

Figura 5.13 - Imagem de MEV do pó de HA sintetizada com ácido abiético (AA). Aumento de 500x e 75000x

Na Figura 5.13 observamos o aglomerado de pó de AA. E comparando com as partículas de HA observamos que as partículas de AA possuem uma menor tendência de aglomeração.

Figura 5.14 - Imagem de MEV do pó de HA sintetizada com ácido deoxicólico (AD). Aumento de 500x e 75000x

Na Figura 5.14 observamos o aglomerado de pó de AD. E comparando com as partículas de HA e AA observamos que as partículas de AD são as que possuem menor tendência de aglomeração.

5.1.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de Microscopia de Força Atômica do pó de hidroxiapatita sintetizados podem ser observados nas figuras abaixo (Figura 5.15, Figura 5.16 e Figura 5.17).

Figura 5.15 - Imagem de AFM do pó de HA

Na Figura 5.15 observamos que as partículas de HA apresentam-se menos aglomeradas e com um formato mais esférico e superfície mais regular.

Figura 5.16 - Imagens de AFM do pó de AA em diferentes aproximações

Nas imagens da Figura 5.16 observamos que as partículas de AA apresentam-se mais aglomeradas e em um aumento maior observamos a irregularidade da superfície destes aglomerados.

Figura 5.17 - Imagens de AFM do pó de AD em diferentes aproximações

Nas imagens da Figura 5.17 observamos que as partículas de AD apresentam-se semelhantes às da AA, formando aglomerados com superfície irregular.

5.2 Interação das hidroxiapatitas sintetizadas e as fibras colágenas expostas da dentina

Para avaliarmos a interação da partícula de ácido deoxicólico em dentina bovina, utilizamos os métodos de microscopia confocal raman e teste de resistência ao cisalhamento (antes e após a termociclagem).

5.2.1 Análise da interface adesiva em microscópio confocal Raman

Nas imagens da interface adesiva por microscópio confocal Raman foi possível observar a formação de uma camada híbrida íntegra tanto na amostra controle como na amostra DEO (onde foi depositada hidroxiapatita modificada por ácido deoxicólico durante o procedimento adesivo). Após a termociclagem não houve alteração na morfologia das camadas híbridas de ambas as amostras.

Para obtenção de todas as imagens no aumento de 20X os parâmetros utilizados foram: 400 linhas X 225 pontos, imagem de 160 X 90, tempo de integração 0,01 segundos, potência do laser 25W e utilizando EMCCD. Para obtenção de todas as imagens no aumento de 100X os parâmetros utilizados foram: 200 linhas X 125 pontos, imagem de 40 X 25, tempo de integração 0,05 segundos, potência do laser 25W e utilizando EMCCD.

Figura 5.18 - Imagem óptica da amostra controle antes da termociclagem em um aumento de 20X. O quadrado em vermelho indica a região escolhida para realização da varredura e obtenção da imagem Raman

Na Figura 5.18 observamos a imagem óptica da amostra controle, em um aumento de 20X, obtida através do Microscópio Confocal. Nela podemos observar os *tags* de resina e a camada híbrida íntegra formada após o procedimento adesivo convencional realizado com o sistema adesivo de 3 passos.

Figura 5.19 - Imagem Raman da amostra controle antes da termociclagem em um aumento de 20 X, com os respectivos espectros característicos ao lado

Na Figura 5.19 observamos a imagem Raman obtida após a varredura da região escolhida (marcada em vermelho na imagem óptica da Figura 5.18). Além disso, podemos observar o espectro característico da região onde há maior quantidade de HA (interior dos túbulos dentinários) caracterizado pelo pico na região de 924 a 987 cm^{-1} referente ao estiramento simétrico do grupo PO_4^{3-} e região onde há maior quantidade de resina, caracterizado pelo pico na região de 3000 a 3200 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-H.

Figura 5.20 - Imagem óptica da amostra controle antes da termociclagem em um aumento de 100X. O quadrado em vermelho indica a região escolhida para realização da varredura e obtenção da imagem Raman

Na Figura 5.20 observamos a imagem óptica da amostra controle antes da termociclagem em um aumento de 100X obtida através do Microscópio Confocal. Nela podemos observar os *tags* de resina e a camada híbrida íntegra formada após o procedimento adesivo convencional realizado com o sistema adesivo de 3 passos em um aumento maior.

Figura 5.21 - Imagem Raman da amostra controle antes da termociclagem em um aumento de 100 X, com os respectivos espectros característicos ao lado

Na Figura 5.21, em um aumento de 100X, podemos observar a infiltração da resina no interior dos túbulos, a formação dos *tags* e a íntima ligação entre resina e dentina, mostrando a formação de uma camada híbrida íntegra.

Figura 5.22 - Imagem óptica da amostra DEO antes da termociclagem em um aumento de 20X. O quadrado em vermelho indica a região escolhida para realização da varredura e obtenção da imagem Raman

Na Figura 5.22 observamos a imagem óptica da amostra DEO antes da termociclagem em um aumento de 20X obtida através do Microscópio Confocal. Nela podemos observar os *tags* de resina e a camada híbrida íntegra formada após o procedimento adesivo convencional realizado com o sistema adesivo de 3 passos.

Figura 5.23 - Imagem Raman da amostra DEO antes da termociclagem em um aumento de 20 X, com os respectivos espectros característicos ao lado

Figura 5.24 - Imagem óptica da amostra DEO antes da termociclagem em um aumento de 100X. O quadrado em vermelho indica a região escolhida para realização da varredura e obtenção da imagem Raman

Na Figura 5.24, em um aumento de 100X, podemos observar a infiltração da resina no interior dos túbulos, a formação dos *tags* e a íntima ligação entre resina e dentina, mostrando a formação de uma camada híbrida íntegra na amostra DEO antes da termociclagem.

Figura 5.25 - Imagem Raman da amostra DEO antes da termociclagem em um aumento de 100 X, com os respectivos espectros característicos ao lado

Nas Figura 5.23 e Figura 5.25, observamos em diferentes aumentos (100x e 20X) que a deposição de partículas de hidroxiapatita modificada por ácido deoxicólico (DEO) não alterou a morfologia da camada híbrida quando comparada ao grupo controle.

Figura 5.26- Imagem óptica da amostra controle depois da termociclagem em um aumento de 20X. O quadrado em azul indica a região escolhida para realização da varredura e obtenção da imagem Raman

Na Figura 5.26 observamos a imagem óptica da amostra controle depois da realização da termociclagem em um aumento de 20X. Nela podemos ver a interface íntegra sem indícios de fraturas.

Figura 5.27 - Imagem Raman da amostra controle depois da termociclagem em um aumento de 20 X, com os respectivos espectros característicos ao lado

Figura 5.28 - Imagem óptica da amostra controle depois da termociclagem em um aumento de 100X. O quadrado em vermelho indica a região escolhida para realização da varredura e obtenção da imagem Raman

Na Figura 5.28 observamos a imagem óptica da amostra controle depois da realização da termociclagem em um aumento de 100X. Nela podemos ver a interface íntegra sem indícios de fraturas.

Figura 5.29 - Imagem Raman da amostra controle depois da termociclagem em um aumento de 100 X, com os respectivos espectros característicos ao lado

Figura 5.30- Imagem óptica da amostra DEO depois da termociclagem em um aumento de 20X. O quadrado em vermelho indica a região escolhida para realização da varredura e obtenção da imagem Raman

Na Figura 5.30 observamos a imagem óptica da amostra DEO depois da realização da termociclagem em um aumento de 20X. Nela podemos ver a interface íntegra sem indícios de fraturas mesmo após a realização da termociclagem.

Figura 5.31 - Imagem Raman da amostra DEO depois da termociclagem em um aumento de 20 X, com os respectivos espectros característicos ao lado

Figura 5.32 - Imagem óptica da amostra DEO depois da termociclagem em um aumento de 100X. O quadrado em vermelho indica a região escolhida para realização da varredura e obtenção da imagem Raman

Na Figura 5.32 observamos a imagem óptica da amostra DEO depois da realização da termociclagem em um aumento de 100X. Nela podemos ver a interface íntegra sem indícios de fraturas.

Figura 5.33 - Imagem Raman da amostra DEO depois da termociclagem em um aumento de 100 X, com os respectivos espectros característicos ao lado

Após a realização da termociclagem, as amostras controle e DEO foram novamente observadas no microscópio confocal Raman. Nas Figura 5.27 e Figura 5.29, observamos que após a ciclagem térmica não houve alteração na morfologia da camada híbrida do grupo controle, ela permaneceu intacta, sem indícios de descolamento. O mesmo aconteceu com o grupo DEO (Figura 5.31 e Figura 5.33).

5.2.2 Resistência ao Cisalhamento antes e depois da ciclagem térmica

O gráfico da Figura 5.34 apresenta os valores de resistência de união (em MPa) obtidos em teste de cisalhamento, antes e depois da termociclagem (TC). As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. O valor médio de resistência de união do grupo controle antes da termociclagem foi de 20,1 MPa. Após a termociclagem houve uma queda significativa neste valor de resistência para 14,7 MPa. Comparando com o grupo DEO antes da termociclagem podemos ver que o valor de resistência do grupo DEO já é maior que do grupo controle antes da termociclagem, sendo de 25,6 MPa. Após a termociclagem houve uma leve queda no valor de resistência grupo DEO (de 25,6 para 23,3), porém esta queda não foi considerada estatisticamente significativa. E além disso, o valor de resistência de união do grupo DEO após a termociclagem foi considerada estatisticamente igual ao do grupo controle antes da TC.

Figura 5.34 - Valores de resistência de união (em Mpa) ao teste de cisalhamento antes e depois da termociclagem (TC). As colunas representam os valores médios e as barras os desvios padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

Neste estudo tivemos como objetivo verificar a possibilidade da obtenção de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas e avaliar possíveis benefícios da utilização destas durante o processo adesivo em dentina. Estávamos à procura de um material que fosse capaz de melhorar a qualidade da camada híbrida formada, prevenindo a degradação de colágeno e assim aumentando a durabilidade da restauração adesiva, principal desvantagem dos sistemas adesivos atuais.

Atualmente, a hidroxiapatita é o biomaterial cerâmico à base de fosfato de cálcio mais estudado e mais utilizado para aplicações clínicas como substitutos ósseos. Tal fato se deve principalmente à sua biocompatibilidade, ausência de reações adversas, de respostas de corpo estranho ou inflamações e toxicidade seja local ou sistêmica, além da sua capacidade de ligação ao tecido do hospedeiro, propriedade osteocondutora e sua versatilidade físico-química, podendo ser utilizado em cirurgia ortopédica sob diversas morfologias (blocos, cimentos, grânulos, microesferas, entre outros) (393-397). No entanto, a redução no tamanho da partícula de hidroxiapatita da escala micrométrica para a nanométrica pode alterar propriedades como dureza e área superficial, modificando o seu comportamento biológico (398). Por isso, neste estudo optamos pela síntese de hidroxiapatita em escala nanométrica.

A nano-hidroxiapatita é considerada um dos biomateriais com maior biocompatibilidade e bioatividade, e já vem sendo amplamente aplicada em medicina e odontologia como substituo ósseo e na remineralização dentária (48, 399). A redução no tamanho leva a maior reatividade da partícula devido ao aumento da área superficial (399). Evidências demonstram grande similaridade quanto a morfologia e estrutura cristalina das partículas em tamanho nano quando comparadas com a apatita dental (49). Os cristais presentes no esmalte dental parecem ter formato de bastões agulhados medindo aproximadamente 100nm de comprimento, de 30-60nm de largura e 26nm de espessura, enquanto os cristais da dentina possuem tamanho de aproximadamente 20nm (400-402).

Estudo utilizando hidroxiapatita nanoparticulada para tratamento de hipersensibilidade dentinária mostrou oclusão dos túbulos expostos (46). Pesquisas recentes mostram que a nanopartícula de hidroxiapatita possui alto potencial de remineralização de lesões de cárie em esmalte (47-51). Além disso, existem evidências que o tamanho do cristal desempenha um papel essencial na formação dos tecidos duros e possui significativa influência nas propriedades intrínsecas destes cristais, incluindo solubilidade e, conseqüentemente, biocompatibilidade (35, 36). Estudo *in vitro* mostrou que nanopartículas de hidroxiapatita podem simultaneamente reparar e prevenir lesões de erosão iniciais comparadas com partículas de hidroxiapatita com comprimento de centenas de nanômetros (52). Estudos recentes mostram sucesso na incorporação de nanopartículas de hidroxiapatita na formulação de adesivos resinosos (53, 54). A incorporação de 2% de nanopartículas de hidroxiapatita em adesivos resinosos melhorou as propriedades destes materiais, apresentando valores maiores de resistência adesiva ao teste de cisalhamento quando comparados aos adesivos controle (sem adição de nanopartículas) (53). No entanto se formos analisar os estudos citados anteriormente, todos mostram a utilização de partículas de hidroxiapatita pura e, além disso, poucos estudos mostram aplicação de nanopartículas de hidroxiapatita para remineralização de lesões em dentina (48, 55-57). No presente estudo optamos não apenas pela síntese de hidroxiapatita pura, mas também funcionalizadas, para aplicação durante o procedimento adesivo em dentina. Esperávamos que a aplicação das nanopartículas de hidroxiapatita sobre o colágeno exposto após o condicionamento ácido pudesse criar um arcabouço mineral ao redor deste colágeno prevenindo a sua degradação com o tempo. Assim, o objetivo da adição de ligantes durante a síntese foi a criação de nanopartículas com morfologias diferentes afim de se verificar qual delas interagiria melhor com o colágeno, protegendo-o da degradação. Optamos pela adição de ligantes com característica anfifílica, ou seja, moléculas com uma região hidrofílica e outra hidrofóbica, pois a região polar interage com a superfície da partícula de hidroxiapatita em crescimento e as regiões apolares dos ligantes interagem entre si criando uma espécie de micela ao redor da partícula orientando o seu crescimento. Escolhemos o ácido abiético e o deoxicólico pois eram os compostos surfactantes disponíveis no laboratório. A diferença existente entre

eles é a de que o ácido deoxicólico possui a porção apolar mais longa e mais distante da porção polar quando comparada com o ácido abiético, podendo talvez controlar melhor o crescimento.

Para a síntese das hidroxiapatitas optamos pelo método em meio aquoso de precipitação de sais de fosfato de cálcio, pois é o método com o qual o grupo já tinha experiência e possui como principal vantagem a síntese de partículas nanométricas (224-226). Como já foi abordado anteriormente, na revisão de literatura, a maior dificuldade dos métodos de precipitação é o controle das variáveis que influenciam na reação de precipitação, ou seja, pH, temperatura e razão Ca/P dos reagentes, podendo levar a produtos finais com diferentes estequiometrias, cristalinidade e morfologia, contribuindo para diferentes comportamentos *in vivo* e *in vitro* (170). Dentre os parâmetros do processo de precipitação que necessitam de uma atenção maior pode-se citar o pH, temperatura de obtenção, concentração molar dos reagentes, tempo de agitação, tempo de envelhecimento e a velocidade de titulação diretamente relacionada à cinética de reação são as variáveis críticas para pureza e características cristalográficas do material obtido (90). Todas estas variáveis foram estritamente controladas durante o processo de síntese. O pH foi controlado em 9,0, a temperatura da solução próxima a 100, tempo de agitação e envelhecimento (tempo de reação) foi de 8 horas. A composição dos reagentes está relacionada à pureza do material, que pode ou não apresentar íons inesperados na rede, além de diferenças nas características morfológicas e cristalográficas. Utilizamos para a síntese sais de nitrato de cálcio e fosfato de amônio bi básico. Para ajuste de pH foi utilizado o hidróxido de amônio que gera como subprodutos íons NH_4^+ e NO_3^- que ficam solúveis em água. Mas, alguns destes ficam aderidos à nanopartícula de HA. Para que estes subprodutos fossem removidos, fizemos a lavagem e centrifugação do pó após a síntese.

Finalizada a síntese, realizamos a caracterização das partículas sintetizadas antes de testarmos a sua aplicação. A caracterização tem como objetivo não só comprovar se as partículas sintetizadas se tratavam de nanopartículas de hidroxiapatita mas também analisar suas características químicas e morfológicas, para através destas, escolhermos qual delas iríamos utilizar para o teste *in vitro*. Além disso, através dos resultados obtidos com a

caracterização foi possível observar se a adição de ligantes alterou as características químicas e morfológicas comparando com a hidroxiapatita pura.

As partículas produzidas por este método são geralmente, não estequiométricas, com baixa cristalinidade, com morfologia irregular porém nanométricas (224-226). Através da análise por EDX foi possível observar a composição e estequiometria das partículas sintetizadas. As hidroxiapatitas biológicas encontradas no esmalte e dentina normalmente apresentam substituições iônicas em sua estrutura, ou seja, são deficientes de cálcio, carbonatadas, apresentam ausência de estequiometria e razão Ca/P aproximadamente 1,96 (aproximadamente pois como já foi citado elas geralmente são não estequiométricas). Mesmo sabendo que este método geralmente produz hidroxiapatitas não estequiométricas, optamos por ele pois, a estequiometria não era a prioridade, já que a apatita biológica normalmente também não é estequiométrica. Os resultados por EDX comprovaram a composição, indicando a presença de cálcio e fósforo nas 3 hidroxiapatitas sintetizadas. Além disso, mostraram que a adição dos ligantes ácido abiético e deoxicólico não alterou significativamente a razão Ca/P e, portanto, não alterou a composição das partículas comprovando que mesmo com a adição dos ligantes, ocorreu a síntese de hidroxiapatita. As partículas sintetizadas com adição de ligantes possuem a razão Ca/P semelhantes à hidroxiapatita pura (aproximadamente 2,0) e próximas a hidroxiapatita biológica encontrada nos tecidos mineralizados, mostrando que apesar de este método de síntese gerar partículas não estequiométricas, não altera significativamente a estequiometria uma vez que a razão Ca/P foi semelhante para todas as moléculas analisadas.

As análises de DRX apresentaram difratogramas das partículas sintetizadas com os picos característicos do padrão cristalino da hidroxiapatita, que são os picos compreendidos entre 20.000 e 60.000 2-theta. A adição dos ligantes, ácido abiético e ácido deoxicólico, causou uma leve diminuição da cristalinidade das partículas, já que os respectivos difratogramas apresentaram picos mais largos e com intensidade menor quando comparados ao difratograma da hidroxiapatita pura. A adição de ligantes durante a síntese diminuiu levemente a cristalinidade, porém sem alterar o padrão cristalino. Os picos com menor intensidade sugerem menor cristalinidade das hidroxiapatitas com ligantes (403, 404), ou seja, provavelmente a adição de ligantes aumentou a

solubilidade da nanopartícula de hidroxiapatita o que seria bom para a aplicação em colágeno, já que estas poderiam se difundir melhor ao apresentarem maior solubilidade.

O método de precipitação normalmente dá origem a partículas nanométricas (224-226). Neste estudo realizamos o teste de DLS para avaliar o tamanho das partículas sintetizadas. Analisando o resultado de DLS da partícula de HA sintetizada sem adição de ligantes observamos no gráfico uma distribuição de tamanho homogênea com 100% das partículas apresentando tamanho médio de 37,8 nm. A adição de ácido abiético durante a síntese modificou o padrão de tamanho das partículas, que passou a apresentar uma distribuição mais heterogênea, ou seja partículas com tamanhos diferentes, onde 61,1% das partículas apresentam tamanho médio de 264,1 nm e 38,9% tamanho médio de 92,4 nm. Já com a adição do ácido deoxicólico observa-se uma distribuição mais homogênea e semelhante à da HA sintetizada pura, mostrando que a adição de ácido deoxicólico resultou em partículas com distribuição de tamanho mais semelhante à da hidroxiapatita sintetizada sem adição de ligantes. No entanto, essas partículas apresentaram tamanho de 223 nm, ou seja houve um aumento no tamanho das partículas. Analisando os valores em nm das partículas sintetizadas poderíamos concluir que as partículas AA e AD não podem ser consideradas nanopartículas, já que apresentam tamanho maior que 100 nm. No entanto, o DLS indica o tamanho das partículas em suspensão, ou seja, o valor apresentado não representa o tamanho real das partículas, mas sim o tamanho do seu raio hidrodinâmico destas partículas em movimento, baseado no fato de que partículas com o menor raio hidrodinâmico se movimentam com uma velocidade maior. Assim, as partículas sintetizadas com ligantes apresentaram maior raio hidrodinâmico, nos levando a concluir que provavelmente, com a adição de ligantes, houve o crescimento da partícula preferencialmente para uma das dimensões, tornando-a com formato de bastonete e, por isso, apresentando um raio hidrodinâmico maior, quando comparada à partícula de HA pura.

Nas imagens de MET podemos observar que todas as partículas sintetizadas apresentam tamanho menor do que 100 nm e, portanto são nanopartículas, comprovando o que foi observado nos resultados de DLS. Quanto a morfologia, as partículas sintetizadas pelo método de precipitação

podem ter formato tipo agulha/esférica ou nanobastões (227). Através das imagens de MET podemos observar morfologia com formato de bastonete para todas as partículas semelhante a HA encontrada no esmalte e dentina (399). Com a adição dos ligantes, esperávamos partículas com tamanho e morfologia diferentes da hidroxiapatita pura, já que estes surfactantes foram adicionados com o intuito de orientar o crescimento do cristal. Diante dos resultados obtidos vimos que houve alteração do raio hidrodinâmico das partículas em movimento, no entanto, quanto a morfologia se mostraram muito semelhantes tanto comparando com a hidroxiapatita pura como comparando as hidroxiapatitas com ligantes diferentes.

A literatura mostra que as partículas sintetizadas por este método facilmente se agregam e que esta agregação pode ser superada pela adição de dispersantes orgânicos, polímeros ou tensoativos (227). No presente estudo podemos observar a tendência de agregação das partículas nas imagens de MEV realizadas dos pós de hidroxiapatita, sendo que as amostras sintetizadas com adição de surfactantes (AA e AD) apresentaram menor aglomeração quando comparadas a HA sintetizada sem ligantes, como já foi comentado anteriormente.

Nos resultados de AFM observamos que a superfície das partículas AA e AD apresentaram-se mais irregulares quando comparadas a HA pura. As partículas de HA pura mostraram-se com formato mais esférico, superfície mais lisa e menor poder de aglomeração. Diferente do que foi observado em MEV, onde as partículas de HA pura apresentaram maior poder de aglomeração. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que para realização das imagens de MEV os pós foram apenas depositados sobre o stub. Já nas imagens de AFM elas foram dispersas em etanol. Portanto, provavelmente, a solubilidade da HA em etanol é maior quando comparada com a solubilidade das partículas com ligantes AA e AD. O poder de aglomeração provavelmente atrapalha a interação das partículas quando aplicadas biologicamente, já que quando estão aglomeradas, as nanopartículas diminuem a área superficial, diminuindo o poder de reatividade destas.

Após a caracterização de todas as partículas sintetizadas e comprovação de que se tratavam de nanopartículas de HA, estas foram testadas sobre a superfície de dentina bovina através de um teste piloto para que fosse possível

optar por qual das hidroxiapatitas seria utilizada sobre o dente. Apesar de termos sintetizado e caracterizado três tipos de HA diferentes optamos apenas por um tipo para realizar o cisalhamento. O teste piloto se mostrou necessário para a escolha da partícula, uma vez que com os resultados da caracterização não foi possível identificar grandes diferenças entre as HA sintetizadas (Anexos de A a E).

Era esperado que mesmo após a lavagem da suspensão, as partículas sintetizadas ficassem ali depositadas. No entanto através da Microscopia Confocal Raman não foi possível diferenciar as partículas de HA depositadas das partículas de HA do dente, com exceção da AD que apresentou uma fluorescência característica do ácido deoxicólico. E assim foi possível comprovar que a HA sintetizada com ácido deoxicólico se encontrava ali mesmo após a lavagem da cavidade. Por isso optamos por testar apenas as partículas AD durante os procedimentos adesivos. Porém no futuro seria interessante testar as outras hidroxiapatitas.

A composição heterogênea do tecido dentinário, sua hidrofiliabilidade e a presença da *smear layer* após o seu preparo com brocas diamantadas, o torna um substrato extremamente complexo quando o assunto é adesão. Nas últimas duas décadas vários foram os avanços e tentativas não apenas para melhorar a adesão em dentina como também para simplificar o modo de aplicação dos sistemas adesivos na clínica odontológica. No entanto, apesar dos esforços, a criação de uma interface adesiva duradoura entre resina e dentina continua sendo o grande desafio da odontologia adesiva (321). Estudos mostram que a interface falha com o tempo levando ao surgimento de microinfiltrações, pigmentação, cáries secundárias, trincas, fraturas e até a completa perda da restauração. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* observaram diminuição da resistência de união em dentina ao longo do tempo (10, 14, 18, 23, 356, 357, 405). Hashimoto et al. encontraram queda de 67% na resistência de união ao teste de microtração entre os espécimes envelhecidos por 24hrs e 1 ano (27). As principais razões apontadas para as falhas das restaurações adesivas são a perda de retenção e adaptação marginal (4, 5). Quando expostos ao meio bucal, os adesivos tendem a diminuir a sua estabilidade e conseqüentemente, a longevidade. Sorção de água é apontada como principal fator desestabilizador dos adesivos ao longo do tempo (386, 406). A literatura apresenta redução na

resistência de união e mudanças morfológicas na interface dentina/resina após armazenamento em água (13, 23, 367). Aproximadamente 3 meses após, todas as classes de adesivos exibiram evidências mecânicas e morfológicas de degradação (10). No entanto, as falhas na interface adesiva não estão relacionadas apenas à degradação de polímero.

Fibrilas colágenas quando expostas estão susceptíveis à hidrólise (14, 20-23) e à ação principalmente das metaloproteinases (MMPs) (28, 32, 288, 379). A fim de evitar esta degradação, através da criação de um arcabouço ao redor do colágeno exposto e assim aumentar a durabilidade da restauração neste estudo decidimos aplicar a nanopartícula modificado por ácido deoxicólico durante o procedimento adesivo convencional e comparar tanto a resistência imediata como a mediata com o controle que seria o procedimento adesivo convencional. As MMPs agem sobre as fibrilas colágenas da porção profunda que não foram completamente infiltradas pelos monômeros hidrofílicos, e por isso ficaram expostas. Se as nanopartículas de HA conseguissem infiltrar até a porção profunda, envolver todas as fibrilas, e protegê-las da degradação, a resistência de união da interface poderia ser aumentada.

Neste estudo, optamos pela utilização do sistema adesivo de 3 passos (*“etch and rinse”*), considerado ainda o padrão ouro em relação a durabilidade, quando comparados aos outros sistemas adesivos disponíveis atualmente (10). Após o condicionamento ácido da superfície de dentina, as fibras colágenas são expostas, e para a perfeita infiltração dos monômeros hidrofílicos presentes no *primer* é necessário que não ocorra o colapsamento das fibras. Decidimos utilizar o etanol 50% previamente a aplicação da solução de hidroxiapatita DEO, baseado em estudos anteriores onde se utilizava concentrações crescentes de etanol para que houvesse a lenta substituição da água pelo etanol (386), e assim houvesse tempo para a infiltração das nanopartículas de hidroxiapatita entre as fibrilas colágenas. Além disso, as nanopartículas de hidroxiapatita possuem boa solubilidade em etanol, o que facilitaria a penetração por entre as fibrilas. No grupo controle não foi realizada a aplicação do etanol 50% previamente a aplicação do *primer* pois em um estudo piloto realizado anteriormente, a inclusão de tal passo não apresentou alteração nos valores de resistência de união ao teste de cisalhamento, assim optamos por manter o método convencional como controle.

Foram utilizados dentes bovinos devido a facilidade de obtenção comparado a dentes humanos. Os dentes bovinos já vêm sendo amplamente utilizados como substitutos de dentes humanos para testes *in vitro* de análise de resistência de união de diversos procedimentos adesivos tanto em esmalte como dentina. No entanto, estudos recentes mostram diferenças estruturais na dentina de dentes bovinos quando comparados a dentes humanos (407, 408). Ao contrário dos dentes humanos, onde o diâmetro dos túbulos aumenta gradualmente da junção amelo-dentinária para a polpa, nos dentes bovinos os túbulos são mais amplos na região mais próxima à junção amelo-dentinária (407). No entanto, um estudo recente mostrou que apesar de os valores quantitativos de resistência de união ao cisalhamento em dentes bovinos terem sido diferentes de dentes humanos, as análises de fratura não apresentaram diferenças, ou seja, o fenômeno pode ser compatível apesar dos valores absolutos se mostrarem diferentes (408).

Neste estudo foram avaliados a resistência de união imediata (24 horas após a realização do procedimento adesivo) e mediata (1 semana após o procedimento adesivo) ao teste de cisalhamento em dentina bovina. A avaliação da resistência mediata foi feita após a realização da ciclagem térmica equivalendo a 1 ano de envelhecimento

Vários fatores, como origem do tecido dentinário (humano ou bovino), espessura de *smear layer*, o teste utilizado, velocidade do teste, área da superfície de adesão, preparação prévia da superfície e fatores relacionados ao operador influenciam os valores de resistência de união dos sistemas adesivos aos tecidos dentais (409-411).

O teste realizado neste estudo foi o de cisalhamento ou também denominado de macro cisalhamento já que a área da secção transversal adesiva foi de $4,33 \text{ mm}^2$, sendo que o valor para ser considerado micro cisalhamento é de 1 mm^2 (412).

A termociclagem é um processo utilizado em estudos *in vitro* com o intuito de submeter restauração, dente e interface, a temperaturas compatíveis com as encontradas na cavidade oral. Durante a termociclagem os espécimes são submetidos a mudanças de temperatura e também a exposição à umidade (água). O estresse térmico gera estresse mecânico devido a diferença do coeficiente térmico linear de expansão entre dente e material restaurador,

causando falha na interface adesiva (413-416). Utilizamos 10 000 ciclos alternando 30 segundos a 5°C e 30 segundos a 55°C, o que equivaleria a 1 ano de envelhecimento e degradação *in vivo* (417).

Utilizamos a Microscopia Confocal Raman para análise da interface dentina/resina e avaliação da camada híbrida formada imediatamente (24 horas) após a realização do procedimento adesivo e após a termociclagem, a fim de verificar não só possível alteração na formação da camada híbrida com a aplicação da nanopartícula durante o processo adesivo comparado ao grupo controle como também observar se existe alguma mudança nesta camada híbrida após a termociclagem.

A Microscopia Confocal Raman tem sido considerada uma ferramenta muito útil para determinação do grau de conversão de resinas compostas e análise de penetração de adesivos e desmineralização de dentina, já que ela é capaz de fornecer quantitativamente informações bioquímicas da composição de uma amostra. Através da combinação de espectroscopia e microscopia ela é capaz de detectar e quantificar a composição química de uma amostra (418, 419). Estudo recente mostra que a Microscopia Confocal Raman é capaz de fornecer informações mais precisas da desmineralização da dentina, como o grau de penetração do monômero, além de visualização precisa dos *tags* formados da camada híbrida (420). Além disso, é uma técnica considerada não destrutiva e que requer poucos preparos dos espécimes (419). No presente estudo o fato de ser uma técnica não destrutiva ajudou bastante, já que a mesma amostra foi utilizada para as análises antes e depois da termociclagem.

Apesar de não observarmos alteração na morfologia e nem presença de falhas na camada híbrida dos grupos testados após a termociclagem, esta causou alterações significativas nos valores de resistência de união ao teste de cisalhamento. No gráfico da Figura observamos que a aplicação da suspensão de hidroxiapatita modificada por ácido deoxicólico (DEO) durante o procedimento adesivo causou aumento nos valores de resistência, visto que o grupo controle apresentou valores de resistência média de 20,17 MPa e o grupo DEO 25,61 MPa. Após a termociclagem ambos os grupos sofreram queda nos valores de resistência, porém o valor do grupo DEO TC se apresentou maior do que o grupo controle e controle TC. Diante dos valores apresentados podemos concluir que a aplicação de nanopartículas de hidroxiapatita modificada por ácido

deoxicólico previamente à aplicação do *primer* durante o procedimento adesivo foi capaz de melhorar a resistência de união tanto mediata como imediata ao teste de cisalhamento.

Os valores aumentados de resistência não podem estar relacionados ao uso de etanol já que o modo como foi utilizado o álcool difere da técnica *ethanol-bonding*. Nesta, preconiza-se a lenta substituição de água presente entre as fibrilas de colágeno por etanol, buscando criar um ambiente isento de água, para então infiltrar monômeros mais hidrofóbicos e, portanto, mais resistentes à hidrólise (386-389). Apesar de estudos mostrarem a eficiência desta técnica alternativa de hibridização da dentina na manutenção dos valores de resistência ao longo do tempo, comprovando menor susceptibilidade dos monômeros hidrofóbicos à degradação (386-389), esta técnica é considerada inviável clinicamente já que demanda tempo prolongado para ser executada (390). No presente estudo foi utilizado apenas uma concentração de solução de álcool (50%) e com a finalidade de facilitar a infiltração das nanopartículas e possibilitar a lenta e completa substituição de água por nanopartículas de HA. Além disso, foi utilizado *primer* hidrofílico e não hidrofóbico, mostrando que os valores altos de resistência se relacionam não ao uso de álcool apenas mas a infiltração de nanopartículas de HA.

Os altos valores de resistência de união podem estar relacionados com a capacidade que as nanopartículas de hidroxiapatita tem de infiltrar a matriz de colágeno de dentina desmineralizada. Após a infiltração, as nanopartículas podem ter envolvido as fibrilas colágenas expostas após o condicionamento ácido protegendo-as da degradação. Enzimas endógenas como por exemplo as MMPs e catepsinas se tornam ativas a partir do momento em que se encontram livres do componente mineral, ou seja, após o condicionamento com ácido fosfórico, não só proteínas colágenas como também enzimas proteolíticas endógenas (não colágenas) se tornam ativas e aptas a degradar matriz orgânica, e isto ocorre principalmente em tecido dentinário, onde a porcentagem de material orgânico é alta (376, 421, 422). Portanto, esta proteção pode ter inibido a ativação e/ou a ação destas enzimas. Além disso, as nanopartículas parecem formar um arcabouço adequado para a remineralização, uma vez que as partículas infiltradas provavelmente agem como sementes entre a matriz de colágeno criando um ambiente apropriado para o crescimento de mineral (55).

Futuramente, seria interessante testarmos a aplicação das nanopartículas de HA com posterior análise da atividade das MMPs, visando observar se há inativação destas pela presença da hidroxiaptita sintética.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos podemos concluir:

- Obtivemos êxito na síntese de nanopartículas de hidroxiapatita com as metodologias propostas
- A adição de ligantes modificou a morfologia dos cristais de hidroxiapatita sem alteração do padrão de rede cristalográfica
- Os ensaios mecânicos demonstraram que a utilização da hidroxiapatita funcionalizada pelo ácido deoxicólico elevou os valores de resistência de união inicial e preveniu a redução dos valores de resistência de união após a ciclagem térmica, quando comparadas ao grupo controle.

REFERÊNCIAS¹

1. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res.* 1955;34(6):849-53.
2. Goracci C, Sadek FT, Monticelli F, Cardoso PEC, Ferrari M. Microtensile bond strength of self-etching adhesives to enamel and dentin. *J Adhes Dent.* 2004;6(4):313-8.
3. Katchburian EA, Arana-Chavez V, editor. *Histologia e embriologia oral.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
4. Mjor IA, Gordan VV. Failure, repair, refurbishing and longevity of restorations. *Oper Dent.* 2002;27(5):528-34.
5. Mjor IA, Shen C, Eliasson ST, Richter S. Placement and replacement of restorations in general dental practice in Iceland. *Oper Dent.* 2002;27(2):117-23.
6. Inoue S, Vargas MA, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, et al. Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to dentin. *J Adhes Dent.* 2001;3(3):237-45.
7. van Dijken JWV. Clinical evaluation of three adhesive systems in class V non-carious lesions. *Dent Mater.* 2000;16(4):285-91.
8. Brackett WW, Covey DA, St Germain HA. One-year clinical performance of a self-etching adhesive in Class V resin composites cured by two methods. *Oper Dent.* 2002;27(3):218-22.
9. Carrilho MRO, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent.* 2005;18(6):315-9.
10. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *Journal of Dental Research.* 2005;84(2):118-32.

¹ De acordo com estilo Vancouver.

11. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Hiraishi N, Yiu CKY. Water treeing in simplified dentin adhesives - Deja Vu? *Oper Dent*. 2005;30(5):561-79.
12. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials*. 2003;24(21):3795-803.
13. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res*. 1999;78(4):906-11.
14. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*. 2000;79(6):1385-91.
15. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Sano H, Tay FR, Oguchi H, et al. Over-etching effects on micro-tensile bond strength and failure patterns for two dentin bonding systems. *J Dent*. 2002;30(2-3):99-105.
16. Takahashi A, Inoue S, Kawamoto C, Ominato R, Tanaka T, Sato Y, et al. In vivo long-term durability of the bond to dentin using two adhesive systems. *J Adhes Dent*. 2002;4(2):151-9.
17. Hashimoto M, De Munck J, Ito S, Sano H, Kaga M, Oguchi H, et al. In vitro effect of nanoleakage expression on resin-dentin bond strengths analyzed by microtensile bond test, SEM/EDX and TEM. *Biomaterials*. 2004;25(25):5565-74.
18. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003;82(2):136-40.
19. Yang B, Adelung R, Ludwig K, Bossmann K, Pashley DH, Kern M. Effect of structural change of collagen fibrils on the durability of dentin bonding. *Biomaterials*. 2005;26(24):5021-31.
20. Vanmeerbeek B, Dhem A, Goretnicaise M, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative Sem and Tem Examination of the Ultrastructure of the Resin-Dentin Interdiffusion Zone. *Journal of Dental Research*. 1993;72(2):495-501.

21. Watanabe I, Nakabayashi N. Bonding durability of photocured phenyl-P in TEGDMA to smear layer-retained bovine dentin. *Quintessence Int.* 1993;24(5):335-42.
22. Nakabayashi NP, Pashley D.H., editor. *Hybridization of dental hard tissues*. 1 ed. Tokyo: Quintessence Publishing; 1998.
23. Burrow MF, Satoh M, Tagami J. Dentin bond durability after three years using a dentin bonding agent with and without priming. *Dent Mater.* 1996;12(5-6):302-7.
24. Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *J Dent.* 1999;27(3):209-14.
25. Yiu CK, King NM, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Carrilho MR, et al. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials.* 2004;25(26):5789-96.
26. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(6):525-30.
27. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, et al. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res B.* 2003;66B(1):287-98.
28. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004;83(3):216-21.
29. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Marinello F, Tjaderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* 2006;27(25):4470-6.
30. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjaderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B, Appl Biomater.* 2009;90(1):373-80.

31. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(2):160-6.
32. Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007;86(1):90-4.
33. Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007;86(6):529-33.
34. Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004;6:41-75.
35. Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials.* 2006;27(14):2798-805.
36. Hu QH, Tan Z, Liu YK, Tao JH, Cai YR, Zhang M, et al. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mater Chem.* 2007;17(44):4690-8.
37. Reisner DE, editor. *Bionanotechnology II: Global Prospects*: CRC Press. Boca Raton, FL: 2011.
38. Hannig M, Hannig C. Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol.* 2010;5(8):565-9.
39. Kusakabe H, Sakamaki T, Nihei K, Oyama Y, Yanagimoto S, Ichimiya M, et al. Osseointegration of a hydroxyapatite-coated multilayered mesh stem. *Biomaterials.* 2004;25(15):2957-69.
40. Rocca M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Giardino R. Osteointegration of hydroxyapatite-coated and uncoated titanium screws in long-term ovariectomized sheep. *Biomaterials.* 2002;23(4):1017-23.

41. Ge Z, Baguenard S, Lim LY, Wee A, Khor E. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials*. 2004;25(6):1049-58.
42. Wang YY, Liu L, Guo SR. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro. *Polym Degrad Stabil*. 2010;95(2):207-13.
43. Dong ZH, Li YB, Zou Q. Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. *Appl Surf Sci*. 2009;255(12):6087-91.
44. Cai YR, Liu YK, Yan WQ, Hu QH, Tao JH, Zhang M, et al. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. *J Mater Chem*. 2007;17(36):3780-7.
45. Dorozhkin SV. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(3):715-34.
46. Wang R, Wang Q, Wang X, Tian L, Liu H, Zhao M, et al. Enhancement of nano-hydroxyapatite bonding to dentin through a collagen/calcium dual affinitive peptide for dentinal tubule occlusion. *J Biomater Appl* 2014.0885328214523057.
47. Huang SB, Gao SS, Cheng L, Yu HY. Combined effects of nano-hydroxyapatite and *Galla chinensis* on remineralisation of initial enamel lesion in vitro. *J Dent*. 2010;38(10):811-9.
48. Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent*. 2011;39(6):430-7.
49. Vandiver J, Dean D, Patel N, Bonfield W, Ortiz C. Nanoscale variation in surface charge of synthetic hydroxyapatite detected by chemically and spatially specific high-resolution force spectroscopy. *Biomaterials*. 2005;26(3):271-83.
50. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization Potential of Nano-Hydroxyapatite on Initial Enamel Lesions: An in vitro Study. *Caries Res*. 2011;45(5):460-8.
51. Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. [Biomed Mater](#). 2009 Jun;4(3):034104. doi: 10.1088/1748-6041/4/3/034104.

52. Li L, Pan HH, Tao JH, Xu XR, Mao CY, Gu XH, et al. Repair of enamel by using hydroxyapatite nanoparticles as the building blocks. *J Mater Chem*. 2008;18(34):4079-84.
53. Leitune VCB, Collares FM, Trommer RM, Andrioli DG, Bergmann CP, Samuel SMW. The addition of nanostructured hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. *J Dent*. 2013;41(4):321-7.
54. Sadat-Shojai M, Atai M, Nodehi A, Khanlar LN. Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application. *Dent Mater*. 2010;26(5):471-82.
55. Besinis A, van Noort R, Martin N. Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dent Mater*. 2012;28(9):1012-23.
56. Comar LP, Souza BM, Gracindo LF, Buzalaf MA, Magalhaes AC. Impact of experimental nano-HAP pastes on bovine enamel and dentin submitted to a pH cycling model. *Braz Dent J*. 2013;24(3):273-8.
57. Wang ZJ, Sa Y, Ma X, Wang YN, Jiang T. [The preparation of nano-hydroxyapatite and preliminary observation on its effects on the occlusion of dentinal tubule]. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese Journal of Stomatology*. 2009;44(5):297-300.
58. Helmus MT. Materials Selection. In: Wise,DL Trantolo, DJ Altobelli, DE Yaszernski, MJ Gresser, JD Schwartz, ER. *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*. New York: Marcel Dekker; 1995. Part A, v.1, p. 27-59.
59. Williams DF, Black J, Doherty PJ, editor. *Second consensus conference on definitions in Biomaterials*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1992.
60. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates. *J Mater Sci*. 2007;42(4):1061-95.
61. Williams DF. *Definitions in biomaterials*. Progress in Biomedical Engineering, 4. Amsterdam: Elsevier; 1987.

62. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 2003;24(13):2133-51.
63. Binyamin G, Shafi BM, Mery CM. Biomaterials: a primer for surgeons. *Semin Pediatr Surg*. 2006;15(4):276-83.
64. Brune D. Metal release from dental biomaterials. *Biomaterials*. 1986;7(3):163-75.
65. Okazaki Y, Gotoh E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials*. 2005;26(1):11-21.
66. Jacobs JJ, Silverton C, Hallab NJ, Skipor AK, Patterson L, Black J, et al. Metal release and excretion from cementless titanium alloy total knee replacements. *Clin Orthop Relat Res*. 1999(358):173-80.
67. Merritt K, Brown SA. Release of hexavalent chromium from corrosion of stainless steel and cobalt-chromium alloys. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(5):627-33.
68. Hanawa T. Metal ion release from metal implants. *Mat Sci Eng C-Bio S*. 2004;24(6-8):745-52.
69. Bessho K, Fujimura K, Iizuka T. Experimental long-term study of titanium ions eluted from pure titanium miniplates. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(7):901-4.
70. Basle MF, Bertrand G, Guyetant S, Chappard D, Lesourd M. Migration of metal and polyethylene particles from articular prostheses may generate lymphadenopathy with histiocytosis. *J Biomed Mater Res*. 1996;30(2):157-63.
71. Afonso AS. Interação entre biomateriais e tecido ósseo [tese]. Porto: Universidade do Porto, Faculdade de Medicina Dentária; 1998.
72. Radder AM. Bone-bonding copolymers for hard tissue replacement [thesis]. Leiden: Universiteit Leiden, 1994.
73. Kenney EB, Lekovic V, Carranza FA, Jr., Dimitrijevic B, Han T, Takei H. A comparative clinical study of solid and granular porous hydroxylapatite implants

in human periodontal osseous defects. *J Biomed Mater Res.* 1988;22(12):1233-43.

74. Inoue O, Ibaraki K, Shimabukuro H, Shingaki Y. Packing with high-porosity hydroxyapatite cubes alone for the treatment of simple bone cyst. *Clin Orthop Relat Res.* 1993(293):287-92.

75. Hayashi K, Inadome T, Mashima T, Sugioka Y. Comparison of bone-implant interface shear strength of solid hydroxyapatite and hydroxyapatite-coated titanium implants. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(5):557-63.

76. Kent JN, Block MS, Finger IM, Guerra L, Larsen H, Misiek DJ. Biointegrated hydroxylapatite-coated dental implants: 5-year clinical observations. *J Am Dent Assoc.* 1990;121(1):138-44.

77. Hong L, Klein CP, de Groot K. Histological observations of coated and prestressed dental implants under flexible or rigid loading conditions. *Biomaterials.* 1994;15(5):390-5.

78. Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Hjortdal VE, Juhl GI, Pedersen CM, et al. Gap healing enhanced by hydroxyapatite coating in dogs. *Clin Orthop Relat Res.* 1991(272):300-7.

79. Ono I, Gunji H, Kaneko F, Numazawa S, Kodama N, Yoza S. Treatment of extensive cranial bone defects using computer-designed hydroxyapatite ceramics and periosteal flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1993;92(5):819-30.

80. Pavek V, Novak Z, Strnad Z, Kudrnova D, Navratilova B. Clinical application of bioactive glass-ceramic BAS-O for filling cyst cavities in stomatology. *Biomaterials.* 1994;15(5):353-8.

81. Furusawa T, Mizunuma K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. *Implant Dent.* 1997;6(2):93-101.

82. Low SB, King CJ, Krieger J. An evaluation of bioactive ceramic in the treatment of periodontal osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1997;17(4):358-67.

83. Wilson J, Clark AE, Hall M, Hench LL. Tissue response to Bioglass endosseous ridge maintenance implants. *J Oral Implantol*. 1993;19(4):295-302.
84. Kiani A, Lakhkar NJ, Salih V, Smith ME, Hanna JV, Newport RJ, et al. Titanium-containing bioactive phosphate glasses. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2012;370(1963):1352-75.
85. Higashi S, Yamamuro T, Nakamura T, Ikada Y, Hyon SH, Jamshidi K. Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers. *Biomaterials*. 1986;7(3):183-7.
86. Verheyen CC, de Wijn JR, van Blitterswijk CA, de Groot K. Evaluation of hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: mechanical behavior. *J Biomed Mater Res*. 1992;26(10):1277-96.
87. Santos JD, Knowles JC, Reis RL, Monteiro FJ, Hastings GW. Microstructural characterization of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials*. 1994;15(1):5-10.
88. Lopes MA, Santos JD, Monteiro FJ, Ohtsuki C, Osaka A, Kaneko S, et al. Push-out testing and histological evaluation of glass reinforced hydroxyapatite composites implanted in the tibia of rabbits. *J Biomed Mater Res*. 2001;54(4):463-9.
89. Santos JD, Jha LJ, Monteiro FJ. Surface modifications of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials*. 1995;16(7):521-6.
90. Hench LL, Wilson J. An introduction to bioceramics. Singapore: Wprld Scientific; c1993.
91. Castner DG, Ratner BD. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surf Sci*. 2002;500(1-3):28-60.
92. Heimke G. Biomechanical aspects of joint and tooth replacements. New york: Marcel Dekker; 1995.
93. Elliott JC, editor. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam: Elsevier;1994.

94. Amjad Z, editor. Calcium phosphates in biological and industrial systems. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1998.
95. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci.* 1991;15:1-201.
96. Ren F, Xin R, Ge X, Leng Y. Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites. *Acta Biomater.* 2009;5(8):3141-9.
97. Brown PW. Hydration behavior of calcium phosphates is analogous to hydration behavior of calcium silicates. *Cement Concrete Res.* 1999;29(8):1167-71.
98. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials.* 2009;2(2):399-498.
99. Hannink G, Arts JJ. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury.* 2011;42 Suppl 2:S22-5.
100. Lynn AK, Cameron RE, Best SM, Brooks RA, Rushton N, Bonfield W. Phase mapping: A novel design approach for the production of calcium phosphate-collagen biocomposites. *Key Eng Mat.* 2004;254-2:593-6.
101. Lynn AK, Bonfield W. A novel method for the simultaneous, titrant-free control of pH and calcium phosphate mass yield. *Acc Chem Res.* 2005;38(3):202-7.
102. Albee FH. Studies in bone growth - Triple calcium phosphate as a stimulus osteogenesis. *Ann Surg.* 1920;71:32-9.
103. Monroe EA, Votava W, Bass DB, McMullen J. New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. *J Dent Res.* 1971;50(4):860-1.
104. Levitt SR, Crayton PH, Monroe EA, Condrate RA. Forming method for apatite prostheses. *J Biomed Mater Res.* 1969;3(4):683-4.
105. Nery EB, Lynch KL, Hirthe WM, Mueller KH. Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects. *J Periodontol.* 1975;46(6):328-47.

106. Kawachi EY. Fosfatos de cálcio: porosidade, cristalinidade, potencial de interface e comportamento in vivo [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; Instituto de Química; 1997.
107. da Silva, MHP. Apostila de biomateriais.2006. Disponível em <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAF0o4AF/apostila-biomateriais>>. Acesso em 22 de março de 2013.
108. Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35(8):708-13.
109. Ducheyne P, and Kohn, D.H. Materials for bone and joint replacement. *Materials Science and Technology*. 1992;14:29 - 109.
110. Inagaki M, Kameyama T. Phase transformation of plasma-sprayed hydroxyapatite coating with preferred crystalline orientation. *Biomaterials*. 2007;28(19):2923-31.
111. Wopenka B, Pasteris JD. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mat Sci Eng C-Bio S*. 2005;25(2):131-43.
112. LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater*. 1993;14(1):65-88.
113. Böhner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;31 Suppl 4:37-47.
114. Kalita SJ, Bhatt HA. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. *Mat Sci Eng C-Bio S*. 2007;27(4):837-48.
115. Kannan S, Ventura JMG, Lemos AF, Barba A, Ferreira JMF. Effect of sodium addition on the preparation of hydroxyapatites and biphasic ceramics. *Ceram Int*. 2008;34(1):7-13.
116. Legeros RZ. Biological and Synthetic Apatites. *Hydroxyapatite and Related Materials*. 1994:3-28.

117. Aoki H, editor. Science and Medical Applications of Hydroxyapatite. Tokyo: JAAS - Japanese Association of Apatite Science; 1991.
118. Davies JE, Lowenberg B, Shiga A. The bone-titanium interface in vitro. J Biomed Mater Res. 1990;24(10):1289-306.
119. Brown WE, Mathew M, Tung MS. Crystal-Chemistry of Octacalcium Phosphate. Prog Cryst Growth Ch. 1981;4(1-2):59-87.
120. Varma HK, Yokogawa Y, Espinosa FF, Kawamoto Y, Nishizawa K, Nagata F, et al. In-vitro calcium phosphate growth over functionalized cotton fibers. J Mater Sci Mater Med. 1999;10(7):395-400.
121. M. A. Ishida TMV, L. A. Santos. Modificação da condição de precipitação de hidroxiapatita sintética, Anais do III Cong. Lat. Am. Biomateriais e Órgãos Artificiais, Campinas, SP (2004) 1-12. 2003.
122. Oréfice RL, Pereira MM, Mansur HS. editor. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro; 2006.
123. Bento DA. Análise de resistência mecânica em implantes de osso: um enfoque numérico e experimental [dissertação]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis; 2003.
124. Eanes ED. Crystal-growth of mineral phases in skeletal tissues. Prog Cryst Growth Ch. 1980;3(1):3-15.
125. LeGeros RZ, Sakae T, Bautista C, Retino M, LeGeros JP. Magnesium and carbonate in enamel and synthetic apatites. Adv Dent Res. 1996;10(2):225-31.
126. Vallet-Regi M. Ceramics for medical applications. J Chem Soc Dalton. 2001(2):97-108.
127. LeGeros RZ, Silverstone LM, Daculsi G, Kerebel LM. In vitro caries-like lesion formation in F-containing tooth enamel. J Dent Res. 1983;62(2):138-44.
128. Ogaard B, Rolla G, Ruben J, Dijkman T, Arends J. Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. Scand J Dent Res. 1988;96(3):209-11.

129. Kong LB, Ma J, Boey F. Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process. *J Mater Sci.* 2002;37(6):1131-4.
130. El Shafei GMS, Philip CA, Moussa NA. Fractal analysis of hydroxyapatite from nitrogen isotherms. *J Colloid Interf Sci.* 2004;277(2):410-6.
131. Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri MR, Sorrell CC. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. *Mater Design.* 2003;24(3):197-202.
132. Volkmer TM. Obtenção e caracterização de Hidroxiapatita porosa pelo método *gelcasting* de espumas para uso como implantes [dissertação]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
133. Wheeler EJ, Lewis D. An x-ray study of the paracrystalline nature of bone apatite. *Calcif Tissue Res.* 1977;24(3):243-8.
134. de Jong WF. Mineral substance in bones. *Recl Trav Chim Pay-B.* 1926;45:445-8.
135. Beevers CAM, D.B. The atomic structure of fluorapatite and its relation to that of tooth and bone mineral. *Miner Mag* - 27: 254-259. 1956.
136. Kay JF. Calcium phosphate coatings for dental implants. Current status and future potential. *Dental clinics of North America.* 1992;36(1):1-18.
137. de Souza JEF. Caracterização Estrutural do ácido 3,4,5 - Triacetoxi-Benzóico. [dissertação]. Anápolis: Universidade Estadual de Goiás; 2013.
138. Giacovazzo C, editor. *Fundamentals of Crystallography* (International Union of Crystallography Texts on Crystallography). Oxford: Oxford University Press; 2011.
139. Rossi AMT, J.; Mavropoulos, E.; Moreira, E.L. A ciência e tecnologia das biocerâmicas. *Revista do CBPF* Disponível em: <http://www.cbpfbr/RevistaCBPF/pdf/BioMatpdf> Acesso: maio 2008 [Internet].

140. Misra DN, editor. Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite Springer - pp. 105-114. New York: Plenum Press.; 1984.
141. Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: precipitate formation during setting reactions. *J Mater Sci Mater Med.* 1999;10(3):177-83.
142. Zakharova BS, Komissarova LN, Naumov SV, Traskin VY. Precipitation of Rare-Earth Phosphates from Phosphoric-Acid Solutions. *Inorg Mater+.* 1992;28(8):1387-92.
143. LeGeros RZ, editor. Dense Hydroxyapatite in Handbook of Bioactive Ceramics. New York: CRC Press, v.II; 1990.
144. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Laval JP. Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-ray diffractometry. *J Am Ceram Soc.* 2001;84(2):359-66.
145. Young RA, Elliott JC. Atomic-Scale Bases for Several Properties of Apatites. *Arch Oral Biol.* 1966;11(7):699-&.
146. Mavropoulos E. A hidroxiapatita como absorvedor de metais [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública - Rio de Janeiro; 1999.
147. Ma XY, Ellis DE. Initial stages of hydration and Zn substitution/occupation on hydroxyapatite (0001) surfaces. *Biomaterials.* 2008;29(3):257-65.
148. Suetsugu Y, Tanaka J. Crystal growth and structure analysis of twin-free monoclinic hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 2002;13(8):767-72.
149. Ohta M, Yasuda M, Okamura H. Susceptibility of calcium-deficient hydroxyapatite-collagen composite to irradiation. *Radiation protection dosimetry.* 2001;94(4):385-8.
150. Simpson DR. Substitution in Apatite .2. Low Temperature Fluoride-Hydroxyl Apatite. *Am Mineral.* 1968;53(11-1):1953.

151. Ma QY, Logan TJ, Traina SJ. Lead Immobilization from Aqueous-Solutions and Contaminated Soils Using Phosphate Rocks. *Environ Sci Technol*. 1995;29(4):1118-26.
152. Souza CAS. Produção e caracterização de hidroxiapatita com atividade antimicrobiana.[tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2010.
153. Kanuka JV. Substituição isomorfa do cálcio na hidroxiapatita pelos elementos do grupo de terras raras: [tese]. Donezk: Universidade Técnica Nacional da Ucrânia; 2001.
154. Boechat CB, Eon JG, Rossi AM, Perez CAD, San Gil RAD. Structure of vanadate in calcium phosphate and vanadate apatite solid solutions. *Phys Chem Chem Phys*. 2000;2(18):4225-30.
155. Toma HE, Nakamura M, editor. Química Forense Ampliando o Horizonte da Perícia. São Paulo: Millennium; 2012.
156. Zach M, Hagglund C, Chakarov D, Kasemo B. Nanoscience and nanotechnology for advanced energy systems. *Curr Opin Solid St M*. 2006;10(3-4):132-43.
157. Alves OL. Nanotecnologia, nanocência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. *Parcerias Estratégicas*. 2004:23-40.
158. Williams D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. *Biomaterials*. 2008;29(12):1737-8.
159. Toma HE, editor. O mundo nanométrico: a dimensão do novo século. 2a ed. São Paulo: Oficina de Textos; 2009.
160. Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. C-60 - Buckminsterfullerene. *Nature*. 1985;318(6042):162-3.
161. Iijima S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature*. 1991;354(6348):56-8.

162. Mehta MD. Nanoscience and nanotechnology: assessing the nature of innovation in these fields. *Bulletin of science, technology & Society*. 2002;22(4):269-73.
163. Tok AIY, Boey FYC, Du SW, Wong B. Flame spray synthesis of ZrO₂ nano-particles using liquid precursors. *Mat Sci Eng B-Solid*. 2006;130(1-3):114-9.
164. Biju V, Itoh T, Anas A, Sujith A, Ishikawa M. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391(7):2469-95.
165. Rao CNR, Cheetham AK. Science and technology of nanomaterials: current status and future prospects. *J Mater Chem*. 2001;11(12):2887-94.
166. Barth JV, Costantini G, Kern K. Engineering atomic and molecular nanostructures at surfaces. *Nature*. 2005;437(7059):671-9.
167. Helland A, Kastenholz H. Development of nanotechnology in light of sustainability. *J Clean Prod*. 2008;16(8-9):885-8.
168. Ichinose N, Ozaki Y, Kashū S. *Superfine particle technology*: Springer; 1992.
169. Rajabi-Zamani AH, Behnamghader A, Kazemzadeh A. Synthesis of nanocrystalline carbonated hydroxyapatite powder via nonalkoxide sol-gel method. *Mat Sci Eng C-Bio S*. 2008;28(8):1326-9.
170. Vallet-Regi M, Gonzalez-Calbet JM. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog Solid State Ch*. 2004;32(1-2):1-31.
171. Gopi D, Govindaraju KM, Victor CA, Kavitha L, Rajendiran N. Spectroscopic investigations of nanohydroxyapatite powders synthesized by conventional and ultrasonic coupled sol-gel routes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2008;70(5):1243-5.
172. Xu JL, Khor KA, Dong ZL, Gu YW, Kumar R, Cheang P. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite powders produced in a radio frequency (rf) thermal plasma. *Mat Sci Eng a-Struct*. 2004;374(1-2):101-8.

173. Sun JS, Tsuang YH, Chang WH, Li J, Liu HC, Lin FH. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. *Biomaterials*. 1997;18(9):683-90.
174. Ninomiya JT, Struve JA, Stelloh CT, Toth JM, Crosby KE. Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. *J Orthopaed Res : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2001;19(4):621-8.
175. Fu Q, Rahaman MN, Zhou N, Huang WH, Wang DP, Zhang LY, et al. In vitro study on different cell response to spherical hydroxyapatite nanoparticles. *J Biomater Appl*. 2008;23(1):37-50.
176. Narayanan R, Kwon TY, Kim KH. Direct nanocrystalline hydroxyapatite formation on titanium from ultrasonated electrochemical bath at physiological pH. *Mat Sci Eng C-Bio S*. 2008;28(8):1265-70.
177. Li B, Guo B, Fan HS, Zhang XD. Preparation of nano-hydroxyapatite particles with different morphology and their response to highly malignant melanoma cells in vitro. *Appl Surf Sci*. 2008;255(2):357-60.
178. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 2001;22(11):1327-33.
179. Wang LJ, Nancollas GH. Pathways to biomineralization and biodegradation of calcium phosphates: the thermodynamic and kinetic controls. *Dalton T*. 2009(15):2665-72.
180. Itthagarun A, King NM, Cheung Yuen-Man The effect of nano-hydroxyapatite toothpaste on artificial enamel carious lesion progression: an in-vitro pH-cycling study. *Hong Kong Dental Journal*. 2010;7:61-6.
181. Evans EJ. Toxicity of Hydroxyapatite Invitro - the Effect of Particle-Size. *Biomaterials*. 1991;12(6):574-6.
182. Sun JS, Tsuang YH, Chang WHS, Li J, Liu HC, Lin FH. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. *Biomaterials*. 1997;18(9):683-90.

183. Ninomiya JT, Struve JA, Stelloh CT, Toth JM, Crosby KE. Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. *J Orthopaed Res*. 2001;19(4):621-8.
184. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Guenounou M, Laurent-Maquin D, Frayssinet P, Nardin M. Correlation between sintering temperature of hydroxyapatite particles and the production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Colloid Surface B*. 2003;30(3):207-13.
185. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Balossier G, Frayssinet P, Guenounou M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials*. 2003;24(16):2739-47.
186. Huang J, Best SM, Bonfield W, Brooks RA, Rushton N, Jayasinghe SN, et al. In vitro assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite. *J Mater Sci-Mater M*. 2004;15(4):441-5.
187. Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Laurent-Maquin D, Guenounou M, Phillips TM. The effect of the physical characteristics of hydroxyapatite particles on human monocytes IL-18 production in vitro. *Biomaterials*. 2004;25(28):5921-7.
188. Saleh J, Willke LW, Bassani IA, Kraether L, Molz RF, Santos LA. Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo. *Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências de Materiais*, 16, Porto Alegre. 2004.
189. Santos M, Florentino A, Saeki M, Aparecida A, Lia Fook M, Guastaldi A. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclética Química*. 2005;30(3):29-35.
190. Andres-Verges M, Fernandez-Gonzalez C, Martinez-Gallego M. Hydrothermal synthesis of calcium deficient hydroxyapatites with controlled size and homogeneous morphology. *J Eur Ceram Soc*. 1998;18(9):1245-50.
191. de Campos M, Muller FA, Bressiani AHA, Bressiani JC, Greil P. Comparative study of sonochemical synthesized beta-TCP- and BCP-nanoparticles. *Key Eng Mater*. 2004;254-2:923-6.

192. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(8):7591-621.
193. Pramanik S, Agarwal AK, Rai KN, Garg A. Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process. *Ceram Int*. 2007;33(3):419-26.
194. Zhang HG, Zhu QS. Preparation of fluoride-substituted hydroxyapatite by a molten salt synthesis route. *J Mater Sci-Mater M*. 2006;17(8):691-5.
195. Teshima K, Lee S, Sakurai M, Kamenoy Y, Yubuta K, Suzuki T, et al. Well-formed one-dimensional hydroxyapatite crystals grown by an environmentally friendly flux method. *Cryst Growth Des*. 2009;9(6):2937-40.
196. Tas AC. Molten salt synthesis of calcium hydroxyapatite whiskers. *J Am Ceram Soc*. 2001;84(2):295-300.
197. Petrov OE, Dyulgerova E, Petrov L, Popova R. Characterization of calcium phosphate phases obtained during the preparation of sintered biphasic Ca-P ceramics. *Mater Lett*. 2001;48(3-4):162-7.
198. Tseng YH, Kuo CS, Li YY, Huang CP. Polymer-assisted synthesis of hydroxyapatite nanoparticle. *Mat Sci Eng C-Bio S*. 2009;29(3):819-22.
199. Mochales C, Wilson RM, Dowker SEP, Ginebra MP. Dry mechanosynthesis of nanocrystalline calcium deficient hydroxyapatite: Structural characterisation. *J Alloy Compd*. 2011;509(27):7389-94.
200. Nasiri-Tabrizi B, Honarmandi P, Ebrahimi-Kahrizsangi R, Honarmandi P. Synthesis of nanosize single-crystal hydroxyapatite via mechanochemical method. *Mater Lett*. 2009;63(5):543-6.
201. Fathi MH, Zahrani EM. Mechanochemical synthesis of fluoridated hydroxyapatite nanopowder. *Int J Mod Phys B*. 2008;22(18-19):3099-106.
202. Silva CC, Pinheiro AG, de Oliveira RS, Goes JC, Aranha N, de Oliveira LR, et al. Properties and in vivo investigation of nanocrystalline hydroxyapatite obtained by mechanical alloying. *Mat Sci Eng C-Bio S*. 2004;24(4):549-54.

203. El Briak-BenAbdeslam H, Ginebra MP, Vert M, Boudeville P. Wet or dry mechanochemical synthesis of calcium phosphates? Influence of the water content on DCPD-CaO reaction kinetics. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(2):378-86.
204. Fahami A, Ebrahimi-Kahrizsangi R, Nasiri-Tabrizi B. Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite/titanium nanocomposite. *Solid State Sci*. 2011;13(1):135-41.
205. Honarmandi P, Honarmandi P, Shokuhfar A, Nasiri-Tabrizi B, Ebrahimi-Kahrizsangi R. Milling media effects on synthesis, morphology and structural characteristics of single crystal hydroxyapatite nanoparticles. *Adv Appl Ceram*. 2010;109(2):117-22.
206. Fathi MH, Zahrani EM. Mechanical alloying synthesis and bioactivity evaluation of nanocrystalline fluoridated hydroxyapatite. *J Cryst Growth*. 2009;311(5):1392-403.
207. Kim W, Zhang QW, Saito F. Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite from $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-P}_2\text{O}_5$ and $\text{CaO-Ca}(\text{OH})_2\text{-P}_2\text{O}_5$ mixtures. *J Mater Sci*. 2000;35(21):5401-5.
208. Silva CC, Pinheiro AG, Miranda MAR, Goes JC, Sombra ASB. Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis. *Solid State Sci*. 2003;5(4):553-8.
209. Yeong KCB, Wang J, Ng SC. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO_4 . *Biomaterials*. 2001;22(20):2705-12.
210. Krajewski A, Celotti G, Ravaglioli A, Toriyama M. Spectrometric study of the thermal evolution of mechanochemically prepared hydroxyapatite-based powders. *Cryst Res Technol*. 1996;31(5):637-46.
211. Kim DW, Cho IS, Kim JY, Jang HL, Han GS, Ryu HS, et al. Simple large-scale synthesis of hydroxyapatite nanoparticles: in situ observation of crystallization process. *Langmuir*. 2010;26(1):384-8.
212. Koutsopoulos S, Barlos K, Gatos D, Dalas E. The effect of various Prothymosin alpha fragments on the crystal growth of hydroxyapatite in aqueous solution. *J Cryst Growth*. 2004;267(1-2):306-11.

213. Zhang YJ, Zhou LH, Li D, Xue NC, Xu XD, Li JH. Oriented nano-structured hydroxyapatite from the template. *Chem Phys Lett.* 2003;376(3-4):493-7.
214. Hongquan Z, Yuhua Y, Youfa W, Shipu L. Morphology and formation mechanism of hydroxyapatite whiskers from moderately acid solution. *Materials Research.* 2003;6(1):111-5.
215. Ikoma T, Yamazaki A, Nakamura S, Akao M. Preparation and structure refinement of monoclinic hydroxyapatite. *J Solid State Chem.* 1999;144(2):272-6.
216. Safronova TV, Shekhirev MA, Putlyaev VI. Ceramics based on calcium hydroxyapatite synthesized in the presence of PVA. *Glass Ceram+.* 2007;64(11-12):408-12.
217. Catros S, Guillemot F, Lebraud E, Chanseau C, Perez S, Bareille R, et al. Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature. *Irbm.* 2010;31(4):226-33.
218. Pang YX, Bao X. Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. *J Eur Ceram Soc.* 2003;23(10):1697-704.
219. Lazic S, Zec S, Miljevic N, Milonjic S. The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid. *Thermochim Acta.* 2001;374(1):13-22.
220. Fomin AS, Barinov SM, Ievlev VM, Smirnov VV, Mikhailov BP, Kutsev SV, et al. Nanocrystalline Hydroxyapatite Ceramics. *Inorg Mater.* 2009;45(10):1193-6.
221. Gomez-Morales J, Torrent-Burgues J, Boix T, Fraile J, Rodriguez-Clemente R. Precipitation of stoichiometric hydroxyapatite by a continuous method. *Cryst Res Technol.* 2001;36(1):15-26.
222. Swain SK, Sarkar D. A comparative study: hydroxyapatite spherical nanopowders and elongated nanorods. *Ceram Int.* 2011;37(7):2927-30.
223. Rigo ECdS, Gehrke SA, Carbonari M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação; Synthesis and characterization

of hydroxyapatite formed by precipitation process. *Rev dental press periodontia implantol.* 2007;1(3):39-50.

224. Gibson IR, Bonfield W. Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(4):697-708.

225. Kumta PN, Sfeir C, Lee DH, Olton D, Choi D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomaterialia.* 2005;1(1):65-83.

226. Verwilghen C, Chkir M, Rio S, Nzihou A, Sharrock P, Depelsenaire G. Convenient conversion of calcium carbonate to hydroxyapatite at ambient pressure. *Mat Sci Eng C-Bio S.* 2009;29(3):771-3.

227. Hong YL, Fan HS, Li B, Guo B, Liu M, Zhang XD. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics. *Mat Sci Eng R.* 2010;70(3-6):225-42.

228. Paz A, Guadarrama D, Lopez M, Gonzalez JE, Brizuela N, Aragon J. A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes. *Quim Nova.* 2012;35(9):1724-7.

229. Graham S, Brown PW. Reactions of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite. *J Cryst Growth.* 1996;165(1-2):106-15.

230. Pieters IY, De Maeyer EAP, Verbeeck RMH. Influence of Na⁺ on the stoichiometry of carbonated hydroxyapatite obtained by the hydrolysis of octacalcium phosphate. *Inorganic Chemistry.* 1998;37(24):6392-5.

231. Durucan C, Brown PW. alpha-Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. *J Mater Sci-Mater M.* 2000;11(6):365-71.

232. Shih WJ, Wang MC, Hon MH. Morphology and crystallinity of the nanosized hydroxyapatite synthesized by hydrolysis using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as a surfactant. *J Cryst Growth.* 2005;275(1-2):E2339-E44.

233. Shih WJ, Chen YF, Wang MC, Hon MH. Crystal growth and morphology of the nano-sized hydroxyapatite powders synthesized from CaHPO_4 center dot $2\text{H}_2\text{O}$ and CaCO_3 by hydrolysis method. *J Cryst Growth*. 2004;270(1-2):211-8.
234. Monma H, Kamiya T. Preparation of Hydroxyapatite by the Hydrolysis of Brushite. *J Mater Sci*. 1987;22(12):4247-50.
235. Ito H, Oaki Y, Imai H. Selective synthesis of various nanoscale morphologies of hydroxyapatite via an intermediate phase. *Cryst Growth Des*. 2008;8(3):1055-9.
236. Štulajterová R, Medvecký L. Effect of calcium ions on transformation brushite to hydroxyapatite in aqueous solutions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2008;316(1):104-9.
237. Padmanabhan SK, Balakrishnan A, Chu MC, Lee YJ, Kim TN, Cho SJ. Sol-gel synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods. *Particuology*. 2009;7(6):466-70.
238. Ramanan SR, Venkatesh R. A study of hydroxyapatite fibers prepared via sol-gel route. *Mater Lett*. 2004;58(26):3320-3.
239. Anee TK, Ashok M, Palanichamy M, Kalkura SN. A novel technique to synthesize hydroxyapatite at low temperature. *Mater Chem Phys*. 2003;80(3):725-30.
240. Bose S, Saha SK. Synthesis of hydroxyapatite nanopowders via sucrose-templated sol-gel method. *J Am Ceram Soc*. 2003;86(6):1055-7.
241. Ruban Kumar A, Kalainathan S. Sol–gel synthesis of nanostructured hydroxyapatite powder in presence of polyethylene glycol. *Physica B: Condensed Matter*. 2010;405(13):2799-802.
242. Sanosh KP, Chu MC, Balakrishnan A, Kim TN, Cho SJ. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique. *B Mater Sci*. 2009;32(5):465-70.
243. Bigi A, Boanini E, Rubini K. Hydroxyapatite gels and nanocrystals prepared through a sol-gel process. *J Solid State Chem*. 2004;177(9):3092-8.

244. Kuriakose TA, Kalkura SN, Palanichamy M, Arivuoli D, Dierks K, Bocelli G, et al. Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature. *J Cryst Growth*. 2004;263(1-4):517-23.
245. Bezzi G, Celotti G, Landi E, La Torretta TMG, Sopyan I, Tampieri A. A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation. *Mater Chem Phys*. 2003;78(3):816-24.
246. Fathi MH, Hanifi A, Mortazavi V. Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *J Mater Process Tech*. 2008;202(1-3):536-42.
247. Eshtiagh-Hosseini H, Housaindokht MR, Chahkandi M. Effects of parameters of sol-gel process on the phase evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Mater Chem Phys*. 2007;106(2-3):310-6.
248. Hsieh MF, Perng LH, Chin TS, Perng HG. Phase purity of sol-gel-derived hydroxyapatite ceramic. *Biomaterials*. 2001;22(19):2601-7.
249. Jillavenkatesa A, Hoelzer DT, Condrate RA. An electron microscopy study of the formation of hydroxyapatite through sol-gel processing. *J Mater Sci*. 1999;34(19):4821-30.
250. Chen JD, Wang YJ, Chen XF, Ren L, Lai C, He W, et al. A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders. *Mater Lett*. 2011;65(12):1923-6.
251. Ioitescu A, Vlase G, Vlase T, Ilia G, Doca N. Synthesis and characterization of hydroxyapatite obtained from different organic precursors by sol-gel method. *J Therm Anal Calorim*. 2009;96(3):937-42.
252. Milev A, Kannangara GSK, Ben-Nissan B. Morphological stability of hydroxyapatite precursor. *Mater Lett*. 2003;57(13-14):1960-5.
253. Montazeri N, Jahandideh R, Biazar E. Synthesis of fluorapatite-hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations. *Int J Nanomed*. 2011;6:197-201.

254. Munguía N, Vázquez CG, Barba CP. Stoichiometric hydroxyapatite obtained by precipitation and sol gel processes. *Revista Mexicana de Física*. 2005;51(3):284-93.
255. Sanosh KP, Chu MC, Balakrishnan A, Lee YJ, Kim TN, Cho SJ. Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. *Curr Appl Phys*. 2009;9(6):1459-62.
256. Liu DM, Yang QZ, Troczynski T, Tseng WJJ. Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2002;23(7):1679-87.
257. Hsieh MF, Perng LH, Chin TS. Formation mechanisms of sol-gel-derived hydroxyapatite using different thermal processings. *J Sol-Gel Sci Techn*. 2002;23(3):205-14.
258. Dourado ER. Preparação e caracterização de hidroxiapatita Nanoestruturada dopada com estrôncio [dissertação]. Rio de Janeiro: Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas; 2006.
259. Zhang GD, Chen JD, Yang S, Yu QF, Wang ZL, Zhang QQ. Preparation of amino-acid-regulated hydroxyapatite particles by hydrothermal method. *Mater Lett*. 2011;65(3):572-4.
260. Jokic B, Mitric M, Radmilovic V, Drmanic S, Petrovic R, Janackovic D. Synthesis and characterization of monetite and hydroxyapatite whiskers obtained by a hydrothermal method. *Ceram Int*. 2011;37(1):167-73.
261. Zhang HQ, Darvell BW. Synthesis and characterization of hydroxyapatite whiskers by hydrothermal homogeneous precipitation using acetamide. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(8):3216-22.
262. Cihlar J, Castkova K. Direct synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by hydrothermal hydrolysis of alkylphosphates. *Monatsh Chem*. 2002;133(6):761-71.
263. Ioku K, Yamauchi S, Fujimori H, Goto S, Yoshimura M. Hydrothermal preparation of fibrous apatite and apatite sheet. *Solid State Ionics*. 2002;151(1-4):147-50.

264. Yasukawa A, Matsuura T, Nakajima M, Kandori K, Ishikawa T. Preparation of nonstoichiometric calcium hydroxyapatite using formamide. *Mater Res Bull.* 1999;34(4):589-601.
265. Manafi S, Rahimpour MR. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite nanorods via hydrothermal conditions. *Chem Eng Technol.* 2011;34(6):972-6.
266. Zhang HQ, Zhang M. Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios. *Mater Chem Phys.* 2011;126(3):642-8.
267. Guo XY, Xiao P, Liu J, Shen ZJ. Fabrication of nanostructured hydroxyapatite via hydrothermal synthesis and spark plasma sintering. *J Am Ceram Soc.* 2005;88(4):1026-9.
268. Neira IS, Guitian F, Taniguchi T, Watanabe T, Yoshimura M. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite whiskers with sharp faceted hexagonal morphology. *J Mater Sci.* 2008;43(7):2171-8.
269. Zhang HQ, Darvell BW. Morphology and structural characteristics of hydroxyapatite whiskers: Effect of the initial Ca concentration, Ca/P ratio and pH. *Acta Biomaterialia.* 2011;7(7):2960-8.
270. Lee DK, Park JY, Kim MR, Jang DJ. Facile hydrothermal fabrication of hollow hexagonal hydroxyapatite prisms. *Crystengcomm.* 2011;13(17):5455-9.
271. Lin KL, Liu XG, Chang J, Zhu YJ. Facile synthesis of hydroxyapatite nanoparticles, nanowires and hollow nano-structured microspheres using similar structured hard-precursors. *Nanoscale.* 2011;3(8):3052-5.
272. Tsiourvas D, Tsetsekou A, Kammenou MI. Controlling the Formation of Hydroxyapatite Nanorods with Dendrimers. *J Am Ceram Soc.* 2011;94(7):2023-9.
273. Xu H, Chen Y, Zhang SF. Synthesis and characterization of microporous hydroxyapatite via hydrothermal method. *Synth React Inorg M.* 2011;41(1):31-5.
274. Zhang HQ, Zhang M. Phase and thermal stability of hydroxyapatite whiskers precipitated using amine additives. *Ceram Int.* 2011;37(1):279-86.

275. Du XW, Chu Y, Xing SX, Dong LH. Hydrothermal synthesis of calcium hydroxyapatite nanorods in the presence of PVP. *J Mater Sci.* 2009;44(23):6273-9.
276. Kandori K, Takeguchi K, Fukusumi M, Morisada Y. Preparation and characterization of calcium hydroxyapatite and balloon-like calcium phosphate particles from forced hydrolysis of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -triphosphate solution. *Polyhedron.* 2009;28(14):3036-42.
277. Earl JS, Wood DJ, Milne SJ. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite. *J Phys Conf Ser.* 2006;26:268-71.
278. Zhang HQ, Darvell BW. Formation of hydroxyapatite whiskers by hydrothermal homogeneous precipitation using acetamide. *J Am Ceram Soc.* 2011;94(7):2007-13.
279. Viswanath B, Ravishankar N. Controlled synthesis of plate-shaped hydroxyapatite and implications for the morphology of the apatite phase in bone. *Biomaterials.* 2008;29(36):4855-63.
280. Yoshimura M, Sujaridworakun P, Koh F, Fujiwara T, Pongkao D, Ahniyaz A. Hydrothermal conversion of calcite crystals to hydroxyapatite. *Mat Sci Eng C-Bio S.* 2004;24(4):521-5.
281. Loo SCJ, Siew YE, Ho S, Boey FYC, Ma J. Synthesis and hydrothermal treatment of nanostructured hydroxyapatite of controllable sizes. *J Mater Sci-Mater M.* 2008;19(3):1389-97.
282. Zhu RH, Yu RB, Yao JX, Wang D, Ke JJ. Morphology control of hydroxyapatite through hydrothermal process. *J Alloy Compd.* 2008;457(1-2):555-9.
283. Sadat-Shojai M, Atai M, Nodehi A. Design of experiments (DOE) for the optimization of hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles. *J Brazil Chem Soc.* 2011;22(3):571-82.
284. Chen JD, Wang YJ, Wei K, Zhang SH, Shi XT. Self-organization of hydroxyapatite nanorods through oriented attachment. *Biomaterials.* 2007;28(14):2275-80.

285. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Jamshidi A. Hydrothermal processing of hydroxyapatite nanoparticles-A Taguchi experimental design approach. *J Cryst Growth*. 2012;361:73-84.
286. Wang AL, Yin HB, Liu D, Wu HX, Wada YJ, Ren M, et al. Effects of organic modifiers on the size-controlled synthesis of hydroxyapatite nanorods. *Appl Surf Sci*. 2007;253(6):3311-6.
287. Jiang DL, Li D, Xie JM, Zhu JJ, Chen M, Lu XM, et al. Shape-controlled synthesis of F-substituted hydroxyapatite microcrystals in the presence of Na(2)EDTA and citric acid. *J Colloid Interf Sci*. 2010;350(1):30-8.
288. Zhang HB, Zhou KC, Li ZY, Huang SP, Zhao YZ. Morphologies of hydroxyapatite nanoparticles adjusted by organic additives in hydrothermal synthesis. *J Cent South Univ T*. 2009;16(6):871-5.
289. Lak A, Mazloumi M, Mohajerani M, Kajbafvala A, Zanganeh S, Arami H, et al. Self-assembly of dandelion-like hydroxyapatite nanostructures via hydrothermal method. *J Am Ceram Soc*. 2008;91(10):3292-7.
290. Chen HF, Sun K, Tang ZY, Law RV, Mansfield JF, Czajka-Jakubowska A, et al. Synthesis of fluorapatite nanorods and nanowires by direct precipitation from solution. *Cryst Growth Des*. 2006;6(6):1504-8.
291. Arce H, Montero ML, Saenz A, Castano VM. Effect of pH and temperature on the formation of hydroxyapatite at low temperatures by decomposition of a Ca-EDTA complex. *Polyhedron*. 2004;23(11):1897-901.
292. Kandori K, Kuroda T, Togashi S, Katayama E. Preparation of calcium hydroxyapatite nanoparticles using microreactor and their characteristics of protein adsorption. *J Phys Chem B*. 2011;115(4):653-9.
293. Gopi D, Bhalaji PR, Prakash VCA, Ramasamy AK, Kavitha L, Ferreira JMF. An effective and facile synthesis of hydroxyapatite powders using oxalic acid-ethylene glycol mixture. *Curr Appl Phys*. 2011;11(3):590-3.
294. El Hammari L, Merroun H, Coradin T, Cassaignon S, Laghzizil A, Saoiabia A. Mesoporous hydroxyapatites prepared in ethanol-water media: Structure and surface properties. *Mater Chem Phys*. 2007;104(2-3):448-53.

295. LI ZJ, Wang PY, Wu ZS. Preparation of nanosized hydroxyapatite particles at low temperatures. *J Mater Sci.* 2005;40(24):6589-91.
296. Wang PP, Li CH, Gong HY, Jiang XR, Wang HQ, Li KX. Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. *Powder Technol.* 2010;203(2):315-21.
297. Supova M. Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(6):1201-13.
298. Shanthi PMS, Ashok M, Balasubramanian T, Riyasdeen A, Akbarsha MA. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite at ambient temperature using cationic surfactant. *Mater Lett.* 2009;63(24-25):2123-5.
299. Yao J, Tjandra W, Chen YZ, Tam KC, Ma J, Soh B. Hydroxyapatite nanostructure material derived using cationic surfactant as a template. *J Mater Chem.* 2003;13(12):3053-7.
300. Liu YK, Hou DD, Wang GH. A simple wet chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods. *Mater Chem Phys.* 2004;86(1):69-73.
301. Viana RB. Espectroscopia de infravermelho de cristalitos de surfactantes [dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Química; 2008.
302. Zhang HG, Zhu QS. Surfactant-assisted preparation of fluoride-substituted hydroxyapatite nanorods. *Mater Lett.* 2005;59(24-25):3054-8.
303. Xiao F, Ye JD, Wang YJ, Rao PG. Deagglomeration of HA during the precipitation synthesis. *J Mater Sci.* 2005;40(20):5439-42.
304. Liu YK, Wang WZ, Zhang YJ, Zheng CL, Wang GH. A simple route to hydroxyapatite nanofibers. *Mater Lett.* 2002;56(4):496-501.
305. Qiu CF, Xiao XF, Liu RF. Biomimetic synthesis of spherical nano-hydroxyapatite in the presence of polyethylene glycol. *Ceram Int.* 2008;34(7):1747-51.

306. Qiu CF, Xiao XF, Liu RF, She HD. Biomimetic synthesis of spherical nano-hydroxyapatite with polyvinylpyrrolidone as template. *Mater Sci Tech-Lond*. 2008;24(5):612-7.
307. Li CF, Meng FT. Nano-crystalline hydroxyapatite synthesized by neutralization with the assist of citric acid. *Mater Lett*. 2008;62(6-7):932-4.
308. Martins MA, Santos C, Almeida MM, Costa MEV. Hydroxyapatite micro- and nanoparticles: nucleation and growth mechanisms in the presence of citrate species. *J Colloid Interf Sci*. 2008;318(2):210-6.
309. Gwinnett AJ. Structure and composition of enamel. *Oper Dent*. 1992;10-7.
310. Mjor IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J*. 2009;20(1):3-16.
311. Marshall GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *Journal of dentistry*. 1997;25(6):441-58.
312. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int*. 1993;24(9):618-31.
313. Landis WJ. Mineral characterization in calcifying tissues: atomic, molecular and macromolecular perspectives. *Connect Tissue Res*. 1996;35(1-4):1-8.
314. Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron-microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976;21(6):355-62.
315. Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Carvalho RM, Russell CM. Bond strength versus dentine structure: a modelling approach. *Arch Oral Biol*. 1995;40(12):1109-18.
316. Butler WT, Richardson, W.S., editor. *Bioquímica das proteínas do dente*. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 1984.
317. Junqueira LCUC, J., editor. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

318. Linden LA, Kallskog O, Wolgast M. Human dentin as a hydrogel. *Arch Oral Biol.* 1995;40(11):991-1004.
319. Vanstrijp AJP, Klont B, Tencate JM. Solubilization of dentin matrix collagen insitu. *J Dent Res.* 1992;71(8):1498-502.
320. Perdigao J, Frankenberger R, Rosa BT, Breschi L. New trends in dentin/enamel adhesion. *Am J Dent.* 2000;13(Spec No):25D-30D.
321. Van Meerbeek B, Perdigao J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. *J Dent.* 1998;26(1):1-20.
322. Perdigao J, Lopes M. Dentin bonding--state of the art 1999. *Compend Contin Educ Dent.* 1999;20(12):1151-8, 60-2; quiz 64.
323. Reis A, Loguercio AD, editor. *Materiais dentários restauradores diretos - dos fundamentos à aplicação clínica.* São Paulo: Santos; 2007.
324. Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorensen SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. *J Dent Res.* 1970;49(6):Suppl:1359-68.
325. Gwinnett AJ. Smear layer: morphological considerations. *Oper Dent Suppl.* 1984;3:2-12.
326. Pashley DH, Tao L, Boyd L, King GE, Horner JA. Scanning electron-microscopy of the substructure of smear layers in human-dentin. *Arch Oral Biol.* 1988;33(4):265-70.
327. Pashley DH. Smear layer: overview of structure and function. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88 Suppl 1:215-24.
328. Eick JD. Smear layer-materials surface. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88 Suppl 1:225-42.
329. Brannstrom M, Vojinovic O. Response of the dental pulp to invasion of bacteria around three filling materials. *ASDC J Dent Child.* 1976;43(2):83-9.

330. Eriksen HM, Leidal TI. Monkey pulpal response to composite resin restorations in cavities treated with various cleansing agents. *Scand J Dent Res*. 1979;87(4):309-17.
331. Pashley DH. Clinical Clinical correlations of dentin structure and function. *J Prosthet Dent*. 1991;66(6):777-81.
332. Swift EJ, Jr., Perdigao J, Heymann HO. Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. *Quintessence Int*. 1995;26(2):95-110.
333. Fusayama T, Nakamura M, Kurosaki N, Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J Dent Res*. 1979;58(4):1364-70.
334. Eliades G, Palaghias G, Vougiouklakis G. Effect of acidic conditioners on dentin morphology, molecular composition and collagen conformation in situ. *Dent Mater*. 1997;13(1):24-33.
335. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982;16(3):265-73.
336. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore Memorial Lecture - Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges. *Oper Dent*. 2003;28(3):215-35.
337. Carvalho RM, Ciucch B, Sano H, Yoshiyama M, Pashley DH. Resin diffusion through demineralized dentin matrix. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*. 1999;13(4):417-24.
338. Agee K, Zhang Y, Carvalho RM, Pashley DH. Fluid flow across demineralized dentin: Effects of solute concentration. *J Dent Res*. 1997;76:51-.
339. Kanca J. Improving Bond Strength through Acid Etching of Dentin and Bonding to Wet Dentin Surfaces. *J Am Dent Assoc*. 1992;123(9):35-43.
340. Kanca J, 3rd. Resin bonding to wet substrate. 1. Bonding to dentin. *Quintessence Int*. 1992;23(1):39-41.

341. Marshall GW, Balooch M, Kinney JH, Marshall SJ. Atomic-force microscopy of conditioning agents on dentin. *J Biomed Mater Res.* 1995;29(11):1381-7.
342. Carvalho RM, Yoshiyama M, Pashley EL, Pashley DH. In vitro study on the dimensional changes of human dentine after demineralization. *Arch Oral Biol.* 1996;41(4):369-77.
343. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SHY. The overwet phenomenon: An optical, micromorphological study of surface moisture in the acid-conditioned, resin dentin interface. *Am J Dent.* 1996;9(1):43-8.
344. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SHY. The overwet phenomenon: A transmission electron microscopic study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent.* 1996;9(4):161-6.
345. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SHY. The overwet phenomenon: A scanning electron microscopic study of surface moisture in the acid-conditioned, resin-dentin interface. *Am J Dent.* 1996;9(3):109-14.
346. Tay FR, Gwinnett JA, Wei SHY. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free, acetone-based, single-bottle primer adhesives. *Dent Mater.* 1996;12(4):236-44.
347. Tay FR, Gwinnett JA, Wei SHY. Relation between water content in acetone/alcohol-based primer and interfacial ultrastructure. *J Dent.* 1998;26(2):147-56.
348. Vanmeerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res.* 1992;71(8):1530-40.
349. Perdigao J, Lopes M. Dentin bonding--questions for the new millennium. *J Adhes Dent.* 1999;1(3):191-209.
350. Breschi L, Perdigao J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Lopes M. Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin. *J Biomed Mater Res A.* 2003;66(4):764-9.

351. Breschi L, Prati C, Gobbi P, Pashley D, Mazzotti G, Teti G, et al. Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: a FEISEM study. *Oper Dent*. 2004;29(5):538-46.
352. Toledano M, Perdigao J, Osorio E, Osorio R. Influence of NaOCl deproteinization on shear bond strength in function of dentin depth. *Am J Dent*. 2002;15(4):252-5.
353. Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P, et al. Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Oper Dent*. 2001;119-44.
354. van Meerbeek B, van Landuyt K, de Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, et al. Technique-sensitivity of contemporary adhesives. *Dent Mater J*. 2005;24(1):1-13.
355. Eick JD, Cobb CM, Chappell RP, Spencer P, Robinson SJ. The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. Part I. *Quintessence Int*. 1991;22(12):967-77.
356. Sano H, Shono T, Takatsu T, Hosoda H. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent*. 1994;19(2):59-64.
357. Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage-leakage within the hybrid layer. *Oper Dent*. 1995;20(1):18-25.
358. Carrilho MR, Reis A, Loguercio AD, Rodrigues Filho LE. Bond strength of four adhesive systems to dentin. *Pesqui Odontol Bras*. 2002;16(3):251-6.
359. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater*. 2001;17(4):296-308.
360. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent*. 1997;25(5):355-72.
361. Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by a Phenyl-P self-etching primer. *Journal of Dental Research*. 1994;73(6):1212-20.

362. Tay FR, Carvalho RM, Pashley DH. Water movement across bonded dentin - too much of a good thing. *J Appl Oral Sci: revista FOB*. 2004;12(spe):12-25.
363. Fritz UB, Finger WJ. Bonding efficiency of single-bottle enamel/dentin adhesives. *Am J Dent*. 1999;12(6):277-82.
364. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*. 2002;30(7-8):371-82.
365. Chersoni S, Suppa P, Grandini S, Goracci C, Monticelli F, Yiu C, et al. In vivo and in vitro permeability of one-step self-etch adhesives. *J Dent Res*. 2004;83(6):459-64.
366. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc*. 2003;69(11):726-32.
367. Gwinnett AJ, Yu SA. Effect of long-term water storage on dentin bonding. *Am J Dent*. 1995;8(2):109-11.
368. Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lail SCN, Yiu CKY, et al. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res*. 2003;82(7):537-41.
369. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials*. 2005;26(33):6449-59.
370. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater*. 2006;22(10):973-80.
371. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 2003;24(4):655-65.
372. Yiu CKY, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, et al. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials*. 2005;26(34):6863-72.

373. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006;22(3):211-22.
374. Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res.* 2002;81(7):472-6.
375. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827-39.
376. Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622-9.
377. Martin-De las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000;45(9):757-65.
378. Tjaderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res.* 2001;15:55-8.
379. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, et al. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater.* 2010;26(6):571-8.
380. Zhang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci.* 2009;1(4):163-76.
381. Vargas MA, Cobb DS, Denehy GE. Interfacial micromorphology and shear bond strength of single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater.* 1997;13(5):316-24.
382. Armstrong SR, Keller JC, Boyer DB. The influence of water storage and C-factor on the dentin-resin composite microtensile bond strength and debond pathway utilizing a filled and unfilled adhesive resin. *Dent Mater.* 2001;17(3):268-76.

383. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(1):46-55.
384. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent.* 2004;6(2):91-5.
385. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res.* 2002;62(3):447-56.
386. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent.* 2007;20(1):7-20.
387. Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA, Sword J, Tay FR, et al. Effects of resin hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res.* 2006;85(11):1016-21.
388. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res A.* 2008;84A(1):19-29.
389. Carrilho MR, Tay FR, Sword J, Donnelly AM, Agee KA, Nishitani Y, et al. Dentine sealing provided by smear layer/smear plugs vs. adhesive resins/resin tags. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(4):321-9.
390. De Vito-Moraes AG. Avaliação da resistência de união e caracterização da camada híbrida formada por adesivos experimentais a base de metacrilato hidrófobo ou solvatado em 10% e 30% de etanol, aplicados sobre dentina saturada com etanol em um estudo de longevidade [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
391. Enderle R, Gotz-Neunhoeffler F, Gobbels M, Muller FA, Greil P. Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of beta-TCP ceramics examined by Rietveld refinement. *Biomaterials.* 2005;26(17):3379-84.
392. Pashley DH, Derkson GD, Tao L, Derkson M, Kalathoor S. The effects of a multi-step dentin bonding system on dentin permeability. *Dent Mater.* 1988;4(2):60-3.

393. Liljensten E, Adolfsson E, Strid KG, Thomsen P. Resorbable and nonresorbable hydroxyapatite granules as bone graft substitutes in rabbit cortical defects. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003;5(2):95-101.
394. Bigi A, Boanini E, Bracci B, Facchini A, Panzavolta S, Segatti F, et al. Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method. *Biomaterials*. 2005;26(19):4085-9.
395. Mitri FF, Yoshimoto M, Allegrini Junior S, Koo S, Carbonari MJ, Konig Junior B. Histological findings in titanium implants coated with calcium phosphate ceramics installed in rabbit's tibias. *Ann Anat*. 2005;187(1):93-8.
396. Calasans-Maia M, Rossi AM, Dias EP, Santos SRA, Ascoli F, Granjeiro JM. Stimulatory effect on osseous repair of zinc-substituted hydroxyapatite: Histological study in rabbit's tibia. *Bioceramics*, Vol 20, Pts 1 and 2. 2008;361-363:1269-72.
397. Ribeiro CC, Barrias CC, Barbosa MA. Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. *J Mater Sci-Mater M*. 2006;17(5):455-63.
398. Allaker RP, Ren GG. Potential impact of nanotechnology on the control of infectious diseases. *T Roy Soc Trop Med H*. 2008;102(1):1-2.
399. Hannig M, Hannig C. Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol*. 2010;5(8):565-9.
400. Bertassoni LE, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. *Caries Res*. 2009;43(1):70-7.
401. Cui FZ, Ge J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *J Tissue Eng Regen M*. 2007;1(3):185-91.
402. Wang LJ, Guan XY, Yin HY, Moradian-Oldak J, Nancollas GH. Mimicking the self-organized microstructure of tooth enamel. *J Phys Chem C*. 2008;112(15):5892-9.

403. Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials*. 2002;23(3):751-5.
404. Kumta PN, Sfeir C, Lee DH, Olton D, Choi D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomater*. 2005;1(1):65-83.
405. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE, et al. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Oper Dent*. 2004;29(6):705-12.
406. Cardoso MV, Neves AD, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J*. 2011;56:31-44.
407. Dutra-Correa M, Anauate-Netto C, Arana-Chavez VE. Density and diameter of dentinal tubules in etched and non-etched bovine dentine examined by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol*. 2007;52(9):850-5.
408. Ruttermann S, Braun A, Janda R. Shear bond strength and fracture analysis of human vs. bovine teeth. *Plos One*. 2013;8(3):e59181.
409. Oliveira SSA, Pugach MK, Hilton JF, Watanabe LG, Marshall SJ, Marshall GW. The influence of the dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs. a total-etch system. *Dent Mater*. 2003;19(8):758-67.
410. Huang MS, Li MT, Huang FM, Ding SJ. The effect of thermocycling and dentine pre-treatment on the durability of the bond between composite resin and dentine. *J Oral Rehabil*. 2004;31(5):492-9.
411. Helvatjoglu-Antoniades M, Koliniotou-Kubia E, Dionyssopoulos P. The effect of thermal cycling on the bovine dentine shear bond strength of current adhesive systems. *J Oral Rehabil*. 2004;31(9):911-7.
412. Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. Effect of cross-sectional surface area on bond strengths between resin and dentin. *Dent Mater*. 1998;14(2):120-8.
413. Crim GA, Garciagodoy F. Microleakage - the effect of storage and cycling duration. *J Prosthet Dent*. 1987;57(5):574-6.

414. Davidson CL, Abdalla AI, Degee AJ. An Investigation into the quality of dentin bonding systems for accomplishing a durable bond. *J Oral Rehabil.* 1993;20(3):291-300.
415. Miyazaki M, Sato M, Onose H, Moore BK. Influence of thermal cycling on dentin bond strength of two-step bonding systems. *Am J Dent.* 1998;11(3):118-22.
416. Titley K, Caldwell R, Kulkarni G. Factors that affect the shear bond strength of multiple component and single bottle adhesives to dentin. *Am J Dent.* 2003;16(2):120-4.
417. Gale MS, Darvell BW. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *J Dent.* 1999;27(2):89-99.
418. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(1):46-55.
419. Santini A, Miletic V. Quantitative micro-Raman assessment of dentine demineralization, adhesive penetration, and degree of conversion of three dentine bonding systems. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(2):177-83.
420. Santini A, Miletic V. Comparison of the hybrid layer formed by Silorane adhesive, one-step self-etch and etch and rinse systems using confocal micro-Raman spectroscopy and SEM. *J Dent.* 2008;36(9):683-91.
421. van Strijp AJP, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res.* 2003;37(1):58-65.
422. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006;85(1):22-32.

ANEXOS

Para o teste piloto foram utilizados 4 incisivos bovinos, onde em cada um deles, foram confeccionadas 2 cavidades, de modo que a dentina ficasse exposta. Após a confecção das cavidades, foi realizado o condicionamento ácido da dentina, utilizando ácido fosfórico a 37% por 15 segundos. Após o condicionamento, as cavidades foram lavadas com jato de ar e água por 30 segundos. Em cada um dos dentes, dentro das duas cavidades, foi aplicada uma suspensão de cada tipo de hidroxiapatita sintetizada (200µg de hidroxiapatita em 200µl de água destilada), assim como mostra o Anexo A. No grupo controle foi colocada água destilada. Os dentes foram fixados com cera dentro de um recipiente com tampa, contendo água destilada, e colocados em estufa a 37°C por 1 semana (Anexo B).

Após 1 semana, as cavidades foram lavadas com jato de ar e água, foram descartadas as raízes dos dentes, e as coroas foram embutidas em resina acrílica, para facilitar o corte e polimento. Para o embutimento foi utilizado resina acrílica quimicamente ativada JET (Clássico Artigos Odontológicos Ltda, São Paulo – SP, Brasil) e silicone de condesação pesada (Optosil – Bayer), assim como mostra o Anexo C.

Após o embutimento as coroas foram seccionadas longitudinalmente, a fim de analisarmos, através da microscopia confocal Raman, a superfície de dentina exposta à suspensão de hidroxiapatita nanoparticulada quando comparada ao controle. Para a realização dos cortes foi utilizado um disco de corte diamantado (Diamond Wafering Blades 1/2"- série 15 HC - EXTEC Corp. Enfield, CT, USA) em uma máquina de corte Isomet 1000 (Buheler, Lake Bluff, IL, EUA). O dente embutido foi fixado à máquina fazendo com que a coroa do dente ficasse perpendicular ao disco, e atentando para que os cortes fossem realizados paralelamente um ao outro. Os cortes foram realizados em baixa velocidade (150 rpm) e sob refrigeração com água (Anexo D).

Foi realizada a microscopia confocal raman posicionando as amostras conforme mostra o Anexo E.

Anexo A- Teste Piloto para determinação da HA a ser utilizada no teste de cisalhamento: esquema representando os 4 incisivos bovinos já com as 2 cavidades, sendo que HA representa a suspensão de hidroxiapatita, ABI, hidroxiapatita com ácido abiético, DEO, hidroxiapatita com ácido deoxicólico e C o controle, com água destilada

Anexo B- Teste Piloto para determinação da HA a ser utilizada no teste de cisalhamento: os 4 dentes já com as suspensões dentro das cavidades e no interior do recipiente. A água no interior do recipiente não chegou a entrar em contato com as cavidades, serviu apenas para manter a umidade

Anexo C- Sequência mostrando o descarte da raiz, confecção de um molde com silicone de condensação para o embutimento da coroa em resina acrílica

Anexo D- Máquina de corte Isomet 1000 utilizada e as amostras obtidas após os cortes

Anexo E- Amostra posicionada no Microscópio Confocal Raman