MARINA DAMASCENO E SOUZA CHIARI

**Desenvolvimento e aplicação de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas
com monômeros ácidos para remineralização dentária**

São Paulo

2018

MARINA DAMASCENO E SOUZA CHIARI

**Desenvolvimento e aplicação de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas
com monômeros ácidos para remineralização dentária**

Versão Original

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga

São Paulo

2018

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

Chiari, Marina Damasceno e Souza.

Desenvolvimento e aplicação de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas com monômeros ácidos para remineralização dentária / Marina Damasceno e Souza Chiari ; orientador Roberto Ruggiero Braga. -- São Paulo, 2018.

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

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biomateriais e Biologia oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Fosfatos de Cálcio. 2. Resinas compostas. 3. Remineralização dentária. I. Braga, Roberto Ruggiero. II. Título.

Chiari MDS. Desenvolvimento e aplicação de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas com monômeros ácidos para remineralização dentária. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / / 2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha família,

Aos meus pais, Norma e Fernando, por fazerem dos meus sonhos os seus. Por serem base e esteio. Por nunca julgarem minhas escolhas e me deixarem voar longe. Muito mais do que eu um dia imaginei.

Ao meu irmão e confidente, Fernando, por ser sempre meu modelo e exemplo de organização e perfeccionismo.

Ao meu noivo, José Thomé, por ter me acompanhado há anos nessa longa caminhada.

Tive o privilégio de ter vocês nessa vida. A vocês minha admiração e agradecimento por serem meu porto seguro e por se manterem junto comigo, onde quer que eu esteja.

Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por caminhar sempre ao meu lado, me proteger e se fazer presente em todos os momentos da minha vida. Por nunca ter me faltado, mesmo quando eu não o percebia. Por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho que, sem dúvida, ajudaram na minha formação.

Agradeço de modo carinhoso e especial à minha família, aos meus pais **Norma** e **Fernando** pelo apoio e amor incondicional. Por terem me “segurado no colo” sempre que precisei. Por valorizarem a educação e por me darem a oportunidade de chegar até aqui. Admiro a história de vida que vocês carregam e espero que um dia eu possa olhar para trás e me orgulhar de ter sido um pouco do que vocês são pra mim, hoje. Ao meu irmão **Fernando**, por dividir comigo as risadas e os choros. Por ser meu melhor amigo e por cuidar de mim de uma maneira que nenhuma outra pessoa seria capaz. Nossa sintonia é inexplicável e você é essencial para que eu possa seguir em frente. Muito obrigada.

À **Maria Sanda dos Santos**, minha “mãe adotiva”. Agradeço por ter tido sua presença durante a minha criação. Por você me suportar e compreender mesmo quando estou em minhas crises. Obrigada por fazer da nossa família sua família também e pelo anos que estamos juntas.

Ao **José Thomé**, meu namorado e noivo, pelo amor, torcida, cumplicidade e paciência. Quando nos conhecemos eu estava no meu primeiro ano de iniciação científica e você esteve ao meu lado durante todo esse percurso. Agradeço por compartilhar meus medos, minhas alegrias e por se orgulhar a cada conquista minha. Você é a presença mais importante, permanente, meu companheiro compreensivo. Mesmo quando ninguém vê. Obrigada por atravessar a tempestade comigo.

Às amigas **Anna Patsea** e **Rafaela Frigério**, por me ensinarem constantemente o valor da amizade. Obrigada pelo exercício diário que vocês fazem para me compreender e me ajudar, por serem sempre meu ombro amigo. Agradeço por ter vocês na minha vida e por conseguirmos nos manter próximas e unidas independente das barreiras físicas. A amizade de vocês é uma das coisas mais importantes que eu tenho e vou levar comigo sempre.

Às minhas “irmãs” **braguetes** que dividem comigo todas as conquistas do nosso grupo, pelo companheirismo e por tornarem nossa rotina mais leve e

prazerosa. À **Marcela Rodrigues**, minha “segunda orientadora”, que me acompanha desde a iniciação científica. Obrigada estar comigo desde o início, pelo seu apoio, seus ensinamentos por ter me inspirado e me feito crescer. Sou muito grata pela sua companhia e pela sua amizade. Vibrarei a cada nova conquista sua e espero chegar lá também. À **Yvette Alania** muito obrigada pela amizade, alegria, conversas e companheirismo, principalmente nesses últimos meses em Chicago. Você é meu exemplo de determinação, organização e paciência. À **Livia Natale** e **Mariel Maas**, por terem alegrado meus dias. Vocês fazem muita falta. À **Luisa Brasil**, que entrou repentinamente na minha vida e fez uma diferença enorme no meu dia a dia. Obrigada pela companhia diária, pelos desabafos e pelos almoços. À **Mirella Correa**, minha companheira. Sem você esse trabalho estaria incompleto. Obrigada por dividir esses dois anos comigo, pelos finais de semana na faculdade, pela paciência, risadas e também pelos tropeços. Atravessamos tantas coisas juntas que faltam palavras para te agradecer por tudo. Às alunas **Handially Vilela**, **Amanda Campos** e **Camila Cabral**. Fico feliz de tê-las acompanhado durante a iniciação científica. Espero poder vê-las seguindo o caminho da pesquisa e crescendo cada vez mais. Obrigada a todas vocês.

Aos amigos que o mundo da Odontologia me deu **Lidia Arashiro**, **Débora Machado**, **Gabriela Magliano** e **Filipi Pereira**. Tive a sorte de tê-los na graduação e o privilégio de levá-los para vida. Vocês são meu refúgio e sei que estarão sempre comigo. Obrigada por todos esses anos de convivência e amizade.

Aos amigos do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral: à **Mariana Reis**, por ter me acolhido tão bem em Chicago, por ter me deixado confiante e me alegrado mesmo nos dias que eu estava desesperançosa. Agradeço por nossos caminhos terem se cruzado de uma forma tão maravilhosa e por poder te ter por perto, principalmente nas horas em que mais preciso. Obrigada pelas risadas, sleep overs e pelas longas conversas sobre a vida. Aos colegas **Alice Jikihara**, **Cláudia Cotomacio**, **Pavel Capetillo**, **Talita Souza**, **Sabrina Mascarenhas**, **Ezequias Rodrigues**, **Erick Lima**, **Stephanie Favero**, **Kelli Monteiro**, **Bruno Lopes**, **Diego Manarão** e **Pedro Albuquerque**. Obrigada pela convivência, pelas disciplinas que fizemos juntos, almoços na copa e pelas conversas entre um experimento e outro.

Agradeço aos professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral: **Profa. Dra. Josete Meira**, **Prof. Dr. Paulo César**, **Prof. Dr. Victor Arana-Chavez**, **Prof. Dr. Leonardo Eloy**, **Prof. Dr. Igor Medeiros** e **Prof. Dr. Carlos Francci**. Em

especial ao **Prof. Dr. Rafael Ballester**, **Prof. Dr. Paulo Capel** e **Prof. Dr. Fernando Neves**, por terem compartilhado suas bancadas comigo durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino. Obrigada por me introduzirem na docência e por todos os ensinamentos. Aprendi muito com cada um de vocês. Em especial à **Profa. Dra. Alyne Simões** por toda a ajuda e apoio com a utilização dos equipamentos de laboratório. Tive o prazer de tê-los como mestres durante minha graduação. Agradeço por terem me mostrado com olhos tão apaixonados o mundo dos Materiais Dentários. Obrigada pelas conversas e pelos ensinamentos que estarão pra sempre na minha memória.

Ao técnico **Antônio Carlos Lascala**, que sempre me socorreu quando estive em apuros com os equipamentos do laboratório. Obrigada pela paciência para me ensinar como cada parafuso se encaixa na Instron e por muitas vezes tê-la deixado pronta para que eu usasse. Obrigada pela competência, prontidão e por ter me ajudado, sempre de forma carinhosa, nas inúmeras vezes que precisei. Agradeço também ao técnico do Laboratório de Biologia Oral **Douglas Nasedal** por ter me ajudado com o preparo de muitas soluções e por todas as vezes que esteve à disposição para me ajudar com o teste de liberação de íons. Muito obrigada!

Agradeço às secretárias **Elidamar Guimarães** e **Rosa Cristina Nogueira** pela paciência, disponibilidade e agilidade para resolver todos os problemas que tive durante a pós graduação. À **Dona Fran**, por todos os cafés e chás e pela preocupação e carinho que sempre teve comigo, muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Oscar Vega**, pela disponibilidade em me ajudar e por toda contribuição com o teste de análise elementar. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Flávio Vichi** e ao **Prof. Dr. Thiago Lewis Reis Hower** por todas as contribuições nas nossas pesquisas principalmente por terem me ajudado durante o processo de síntese e caracterização das partículas. Agradeço também ao técnico, **Welber**, pela disposição, prontidão e apoio. Muito obrigada.

À **Prof. Dra. Ana Carolina Magalhães**, que gentilmente abriu as portas do seu laboratório e me recebeu em Bauru. Muito obrigada pela preocupação e por ter me acompanhado durante a formulação das soluções para ciclagem de pH. Sua ajuda foi imprescindível para que conseguíssemos realizar esse teste.

À **Prof. Dra. Ana Karina Bedran-Russo** por aceitar me receber nesses últimos quatro meses do meu mestrado. Muito obrigada pela orientação, pelos ensinamentos, apoio e doçura. Foi um período intenso, desafiador e de muito

aprendizado. Quatro meses que passaram voando e que me recordarei com muito carinho. Agradeço também à **University of Illinois at Chicago (UIC)** por permitir que esse estágio fosse possível.

À **Livia Trevelin**, por ter me amparado durante o estágio no exterior, apesar da distância e das diferenças de fuso horário. Obrigada pela disposição, paciência, atenção e principalmente pelas longas conversas e conselhos tão valiosos.

À **Marisa Helena de Carvalho**, por me apresentar a Odontologia com uma visão pura, simples e apaixonante. Por me fazer entender que nossa profissão supera os livros e teorias. Por ser o exemplo de uma mulher forte, que ama o que faz. Agradeço por todo apoio que você me deu desde a graduação e por vibrar junto comigo a cada conquista. Muito obrigada.

Às **Profas. Dras. Adriana Bona Matos e Leily Firoozmand** que se tornaram minhas colegas de laboratório nesses últimos meses. Muito obrigada por toda a ajuda, apoio e companheirismo durante o período que estive em Chicago.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de mestrado e da bolsa estágio pesquisa no exterior/BEPE (processo 2016/25971-7 e 2018/02403-9).

À minha casa, **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, representada pelo seu diretor Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga**. Até hoje me recordo quando escrevi o e-mail perguntando sobre a possibilidade de fazer uma iniciação científica e você aceitou me orientar. Acho que foi um dos meus maiores acertos na vida. Obrigada por entrar nessa loucura comigo e por ter me inspirado e me incentivado a continuar. Agradeço pela confiança e por ter acreditado em mim, mesmo nas vezes que nem eu mesma acreditei. Obrigada por guiar meus primeiros passos na área científica, pela paciência, pelo respeito, pela dedicação, pela amizade e por me ensinar muito mais do que eu um dia imaginei. Agradeço também as inúmeras as oportunidades e conquistas que eu tive durante os seis anos que trabalhamos juntos. Espero que esses anos tenham sido tão proveitosos pra você quanto foram pra mim. Vou levar tudo isso comigo, com muito carinho, pra vida inteira. Muito obrigada!

“É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre.”

José Saramago

RESUMO

Chiari MDS. Desenvolvimento e aplicação de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas com monômeros ácidos para remineralização dentária [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

Os objetivos deste estudo foram: 1) sintetizar e caracterizar partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) funcionalizadas com diferentes compostos orgânicos (ácido cítrico/AC, ácido acrílico/AA, fosfato de metacrilóioxietila/MOEP e dimetacrilato de dietilenoglicol/DEGDMA) e 2) avaliar o efeito da incorporação destas partículas sobre as propriedades físico-químicas e potencial remineralizador de compósitos experimentais. Na primeira fase do trabalho, partículas de DCPD foram sintetizadas pelo método da co-precipitação na presença de ácido cítrico, ácido acrílico, MOEP ou DEGDMA ou na ausência de funcionalizantes (não funcionalizadas/NF). As partículas foram caracterizadas por difração de raio x (DRX), análise elementar, densidade teórica, área superficial, difração de laser, microscopia eletrônica de varredura e potencial zeta. Na segunda etapa do trabalho, seis compósitos experimentais foram manipulados contendo dimetacrilato de glicidila bisfenol A (BisGMA)/dimetacrilato de trietileno glicol (TEGDMA) (1:1 em mols), fotoiniciadores e 60 vol% de partículas, sendo essa proporção composta por partículas de vidro de bário silanizadas e 0 vol% (controle, sem DCPD) ou 20 vol% de partículas de DCPD. Os materiais foram avaliados quanto ao grau de conversão (GC), resistência à flexão biaxial (RFB) e módulo flexural (E) após 24 horas e 60 dias em água, liberação de íons e efeito protetor sobre esmalte adjacente à restaurações submetidas a um desafio cariogênico *in vitro*. Os resultados de GC, E, liberação de íons e $\Delta KHN_{\text{superficial}}/\Delta KHN_{\text{transversal}}$ foram submetidos à análise de variância (ANOVA)/ teste de Tukey. Os resultados de RFB foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis/teste de Dunn. Em todos os casos, o nível de significância global foi de 5%. A formação de DCPD foi confirmada através do DRX. A análise elementar comprovou retenção de funcionalizante em níveis acima de 1,5% apenas para DCPD-DEGDMA, que também apresentaram redução na densidade devido à presença do monômero funcionalizante. Os valores de área superficial foram

semelhantes para todas as partículas (22 - 30 m^2/g). Partículas sintetizadas na presença de ácido cítrico apresentaram menor tamanho em relação às demais. Valores de potencial zeta variaram entre -0,9 e -14,2 mV. Todos os compósitos apresentaram GC semelhantes. Para RFB após 24 horas, apenas os materiais contendo DCPD-AA e DCPD-DEGDMA foram estatisticamente semelhantes ao controle, porém, após imersão prolongada, somente o material contendo DCPD-DEGDMA manteve-se estatisticamente semelhante ao controle. Para E, após 24 horas, os compósitos contendo DCPD-NF, DCPD-MOEP, DCPD-DEGDMA ou DCPD-AA foram estatisticamente semelhantes e superiores ao controle. Após imersão, todos os compósitos apresentaram-se semelhantes ao controle, exceto DCPD-AA que apresentou menor módulo. O material contendo DCPD-AC apresentou maiores liberações iônicas do que aquele com DCPD-DEGDMA, o que possivelmente se refletiu no $\Delta\text{KHN}_{\text{superficial}}$ estatisticamente menor dos corpos de prova restaurados com compósito contendo DCPD-AC em comparação ao material contendo DCPD-DEGDMA. Para $\Delta\text{KHN}_{\text{transversal}}$, não houve interação estatisticamente significativa entre os fatores. As maiores reduções foram observadas nas profundidades de 10 μm e 30 μm . Além disso, o esmalte ao redor do compósito contendo DCPD-AA apresentou maior redução em sua KHN do que os materiais contendo DCPD-NF e do que o material controle. A síntese de DCPD foi realizada com êxito. Entretanto, apenas o ácido cítrico foi efetivo para redução do tamanho das partículas. DEGDMA foi o funcionalizante que apresentou maiores teores de retenção na superfície das partículas. Além disso, a funcionalização com DEGDMA favoreceu a interação entre DCPD e a matriz orgânica, o que foi evidenciado pelos maiores valores de resistência à flexão. Todavia, liberação de íons foi comprometida. Em 7 dias os compósitos contendo DCPD não tiveram um efeito protetor contra a desmineralização provocada pela ciclagem de pH.

Palavras-chave: Fosfatos de Cálcio. Resinas compostas. Remineralização dentária.

ABSTRACT

Chiari MDS. Development and application of calcium phosphate particles functionalized with acidic monomers for dental remineralization [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original

The aims of this study were: 1) to synthesize and characterize dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) particles functionalized with different organic agents (citric acid/CA, acrylic acid/AA, methacryloyloxyethyl phosphate/MOEP and diethylene glycol dimethacrylate/DEGDMA) and 2) evaluate the effect of the addition of these particles over physical-chemical properties and remineralization potential of experimental composites. In the first part of the study, DCPD particles were synthesized by a coprecipitation method in the presence of citric acid, acrylic acid, MOEP, DEGDMA or without functionalizing agent (non-functionalized/NF). Particles were characterized by X-ray diffraction (XRD), elemental analysis, density, surface area, laser diffraction, scanning electron microscopy (SEM) and zeta potential. In the second part, six resin-based materials were manipulated, containing in the organic phase bisphenol A glycerolate dimethacrylate (BisGMA)/triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) (1:1 in mols), photoinitiators and 60 vol% of particles, composed by silanized barium glass and 0% (control: without DCPD) or 20 vol% of DCPD particles. Materials were evaluated for degree of conversion (DC), biaxial flexural strength (BFS) and flexural modulus (E) after 24 hours and 60 days of immersion in water, ion release and protective effect on adjacent enamel submitted to an *in vitro* cariogenic challenge. Data from DC, E, ion release $\Delta\text{KHN}_{\text{surface}}/\Delta\text{KHN}_{\text{cross-sectional}}$ were subjected to analysis of variance (ANOVA)/Tukey test. Data from BFS were analyzed using Kruskal–Wallis/Dunn test. In all cases, the global significance level was 5%. DCPD formation was confirmed by XRD. Elemental analysis presented the retention of functionalizing agent retention at levels above 1.5% only for DCPD-DEGDMA, which also had reduction in density due to the presence of the functionalizing monomer. Surface area measurements were similar for all particles (22 - 30 m²/g). Particles synthesized in the presence of citric acid presented smaller size in relation to the others. Zeta potential values ranged from -0.9 to -14.2 mV. All composites presented similar DC. For BFS, after 24 hours, only the materials containing DCPD-AA and DCPD-

DEGDMA were statistically similar to the control, but after prolonged immersion only the material containing DCPD-DEGDMA remained statistically similar to the control. For E, after 24 hours, the composites containing DCPD-NF, DCPD-MOEP, DCPD-DEGDMA or DCPD-AA were statistically similar and presented higher results than the control. After immersion, all composites were similar to the control, except for DCPD-AA, which had lower results. The material containing DCPD-CA presented higher ionic releases than the DCPD-DEGDMA, this possibly reflected on the lower results for $\Delta\text{KHN}_{\text{surface}}$ for the specimens restored with the composite containing DCPD-CA in comparison to DCPD-DEGDMA material. For $\Delta\text{KHN}_{\text{cross-sectional}}$, there was no statistically significant interaction for the factors. The highest reductions were observed at 10 μm and 30 μm depths. Also, the enamel around the composite containing DCPD-AA presented higher reduction in KHN than the materials containing DCPD-NF and than the control. DCPD synthesis was successful. However, only citric acid was effective to reduce particle size. DEGDMA was the functionalizing agent that presented higher levels of retention in the particle surface. In addition, functionalization with DEGDMA favored the interaction between DCPD and the organic matrix, evidenced by the higher results of flexural strength. However ion release was compromised. In 7 days the DCPD-containing composites did not presented a protective effect against the demineralization caused by the pH cycling.

Keywords: Calcium Phosphates. Composite Resins. Tooth Remineralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 4.1 - Fórmulas estruturais do ácido cítrico, ácido acrílico, dimetacrilato de dietilenoglicol (DEGDMA) e fosfato de metacriloiloxietila (MOEP), utilizados na funcionalização das partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD).....48
- Figura 4.2 - Montagem experimental utilizada para o ensaio de resistência à flexão biaxial, mostrando o dispositivo do tipo “pistão sobre três bolas” e a haste do deflectômetro posicionada junto à superfície inferior do corpo de prova. Imagem reproduzida da tese da aluna Marcela Charantola Rodrigues, DOI 10.11606/T.23.2014.tde-19022015-17163754
- Figura 4.3 - Equipamento ICP-OES 700 (Agilent Technologies) utilizado nas análises de liberação de íons. Imagem reproduzida da tese da aluna Marcela Charantola Rodrigues, DOI 10.11606/T.23.2014.tde-19022015-17163755
- Figura 5.1 - Difratogramas das partículas de DCPD sintetizadas no estudo (“DCPD_Puro” se refere às partículas não-funcionalizadas)60
- Figura 5.2 - Partículas de DCPD observadas em microscópio eletrônico de varredura. A: DCPD funcionalizado com ácido acrílico; B: DCPD funcionalizado com DEGDMA; C: DCPD funcionalizado com MOEP; D: DCPD não funcionalizado.....63
- Figura 5.3 - Partículas de DCPD funcionalizadas com ácido cítrico observadas em microscópio eletrônico de varredura. A: menor aumento; B: maior aumento65
- Figura 5.4 - Médias e desvios-padrão dos valores resistência à flexão biaxial (em MPa) em função da partícula de DCPD e do período de armazenamento. Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p>0,05$)....69

Figura 5.5 - Médias e desvios-padrão dos valores de módulo flexural (em GPa) em função da partícula de DCPD e do período de armazenamento. Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$).....	70
Figura 5.6 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material controle após armazenamento em água. A e C: 24 horas; B e D: 60 dias	73
Figura 5.7 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD funcionalizado com ácido acrílico após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60 dias.....	75
Figura 5.8 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD funcionalizado com ácido cítrico após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60 dias.....	77
Figura 5.9 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD funcionalizado com DEGDMA após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60 dias.....	79
Figura 5.10- Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD funcionalizado com MOEP após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60 dias.....	81
Figura 5.11- Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD não funcionalizado após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60 dias.....	83

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Caracterização das partículas sintetizadas no estudo: análise elementar, densidade teórica, área superficial, distribuição de tamanho e potencial zeta62
- Tabela 5.2 - Médias e desvios-padrão para o grau de conversão de compósitos experimentais contendo diferentes partículas de DCPD. Valores seguidos de uma mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)67
- Tabela 5.3 - Médias e desvios-padrão das concentrações de íons cálcio (ppm) liberadas por compósitos experimentais contendo partículas de DCPD em função do período de imersão (em dias). Valores seguidos de uma mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)86
- Tabela 5.4 - Médias e desvios-padrão das concentrações de íons fósforo (ppm) liberadas por compósitos experimentais contendo partículas de DCPD em função do período de imersão (em dias). Valores seguidos de uma mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)87
- Tabela 5.5 - Médias e desvios-padrão das concentrações de íons bário (ppm) liberadas por compósitos experimentais contendo partículas de DCPD em função do período de imersão (em dias). Valores seguidos de uma mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)87
- Tabela 5.6 - Médias e desvios padrão dos dados de $\Delta KHN_{\text{superficial}}$ e $\Delta KHN_{\text{transversal}}$ em função do material e da profundidade analisada. Para $\Delta KHN_{\text{superficial}}$, valores seguidos pela mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre grupos (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)88

Tabela 5.7 - Médias e desvios-padrão dos valores de $\Delta KHN_{\text{transversal}}$ do esmalte bovino para o fator “profundidade”. Valores seguidos da mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa nas linhas (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)..... 89

Tabela 5.8 - Médias e desvios-padrão dos valores de $\Delta KHN_{\text{transversal}}$ do esmalte bovino para o fator “material”. Valores seguidos da mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa nas linhas (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$) 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta KHN_{\text{superficial}}$	Variação na microdureza superficial
$\Delta KHN_{\text{transversal}}$	Variação na microdureza transversal
μg	microgramas
μm	micrômetro
ACP	fosfato de cálcio amorfo
BisGMA	dimetacrilato de glicidila bisfenol A
Ca/P	razão entre o número de átomos de cálcio e átomos de fósforo
Ca^{2+}	íon cálcio
CaP	fosfato de cálcio
CDHA	hidroxiapatita deficiente em cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	centímetros
CO	monóxido de carbono
CO_2	dióxido de carbono
CPP	fosfopeptídeo da caseína do leite
CPP-ACP	complexo fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo
DCPA	fosfato dicálcico anidro
DCPD	fosfato dicálcico dihidratado
DEGDMA	dimetacrilato de dietilenoglicol
DES/RE	ciclagem de pH desmineralizante e remineralizante
DRX	difração de raios X
E	módulo flexural
EBPADMA	bisfenol A dimetacrilato etoxilado
EGDMA	etilenoglicol dimetacrilato
FA	fluorapatita
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
g	grama(s)
GC	grau de conversão
GPa	gigapascal
H^+	cátion hidrogênio/hídron

HA	hidroxiapatita
HCl	ácido clorídrico
HEMA	metacrilato de 2- hidroxietila
HPO_4^{2-}	íon hidrogênio fosfato
H_2PO_4^-	íon dihidrogênio fosfato
J/cm^2	joules dividido por centímetro quadrado
KCl	cloreto de potássio
kV	quilovolt
m^2/g	metro quadrado dividido por gramas
mA	miliampére
MEV	microscópio eletrônico de varredura
ml	mililitro(s)
ml/min	mililitro dividido por minuto
ml/mm^2	mililitros dividido por milímetro quadrado
mm	milímetro(s)
mm^3/ml	milímetros cúbicos divididos por mililitro
mmol/L	milimols divididos por litro
MOEP	fosfato de metacrilatoiloxietila
mol/L	mol dividido por litro
MPa	megapascal
MPTMS	metacriloxipropiltrimetoxisilano
mW/cm^2	miliwatts dividido por centímetro quadrado
NACP	nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo
NaOH	hidróxido de sódio
NH_4NO_3	nitrato de amônio
nm	nanômetros
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	pirofosfato
PAMAM	poliamidoamina
pH	potencial de hidrogênio
ppm	parte por milhão
psi	libra-força por polegada quadrada
r	raio
RFB	resistência à flexão biaxial
RPM	rotações por minuto

s	segundos
TEGDMA	dimetacrilato de trietilenoglicol
TETDMA	dimetacrilato de tetraetileno glicol
TCP	fosfato tricálcico
TTCP	fosfato tetracálcico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
θ	teta
°	graus
°C	grau(s) Celsius
n	número de espécimes por grupo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1	FOSFATOS DE CÁLCIO EM ODONTOLOGIA RESTAURADORA	35
2.2	REMINERALIZAÇÃO	36
2.3	LIBERAÇÃO DE ÍONS	39
2.4	PROPRIEDADES MECÂNICAS	41
2.5	FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE CaP	42
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	SÍNTESE DE PARTÍCULAS DE FOSFATO DE DICÁLCICO DIHIDRATADO FUNCIONALIZADAS	47
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	48
4.2.1	Difração de raio X	48
4.2.2	Análise elementar	49
4.2.3	Densidade teórica	49
4.2.4	Área superficial (método BET)	50
4.2.5	Espalhamento de luz laser	50
4.2.6	Microscopia eletrônica de varredura	50
4.2.7	Potencial zeta	51
4.3	MANIPULAÇÃO DOS MATERIAIS RESINOSOS	51
4.4	GRAU DE CONVERSÃO	51
4.5	RESISTÊNCIA À FLEXÃO BIAXIAL E MÓDULO FLEXURAL	52
4.6	LIBERAÇÃO DE ÍONS	54
4.7	EFEITO PROTETOR SOBRE O ESMALTE SUBMETIDO A DESAFIO CARIOGÊNICO	56
4.7.1	Aspectos éticos	56
4.7.2	Preparo dos espécimes e ciclagem	56
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5	RESULTADOS	59
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	59
5.1.1	Difração de raio X	59

5.1.2	Análise elementar, densidade teórica, área superficial, espalhamento de luz laser e potencial zeta	61
5.1.3	Microscopia eletrônica de varredura	62
5.1	GRAU DE CONVERSÃO	67
5.3	RESISTÊNCIA À FLEXÃO BIAxIAL E MÓDULO FLEXURAL	67
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS SUPERFÍCIES DE FRATURA.....	71
5.5	LIBERAÇÃO DE ÍONS	85
5.6	EFEITO PROTETOR SOBRE O ESMALTE SUBMETIDO A DESAFIO CARIOGÊNICO	88
5.6.1	Delta KHN	88
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE	113
	ANEXO	115

1 INTRODUÇÃO

Partículas de fosfato de cálcio (CaP) incorporadas a compósitos resinosos são capazes de liberar íons cálcio e fosfato e apresentam potencial para remineralização dos tecidos dentários (1-4). Entretanto, a incorporação de partículas de CaP em compósitos resinosos causa reduções significativas em sua resistência à flexão e tenacidade à fratura devido à ausência de interação química entre as partículas de CaP e a matriz resinosa (5-8).

O desempenho mecânico de compósitos resinosos liberadores de íons seria otimizado pela maior união das partículas de CaP com a matriz orgânica, uma vez que esta característica reduziria o risco destas partículas funcionarem como sítios iniciadores de trincas. Adicionalmente, partículas menores apresentariam maior área superficial (9, 10), o que possibilitaria a formulação de compósitos contendo frações volumétricas de CaP menores, mantendo a liberação de íons em níveis capazes de promover a remineralização dos tecidos dentários.

Como forma de estabelecer uma união química com a matriz resinosa, a funcionalização de partículas de hidroxiapatita (HA) e fosfato dicálcico anidro (DCPA) com compostos silânicos foi avaliada e, apesar dos resultados positivos quanto ao desempenho mecânico, a natureza hidrofóbica do silano reduziu significativamente a liberação de íons cálcio e fosfato (11, 12). Ácidos carboxílicos (málico, cítrico, acrílico e metacrílico) também foram testados como funcionalizantes para partículas de HA incorporadas a matrizes resinosas, uma vez que seus grupos carboxílicos são capazes de se unir aos íons cálcio. O material contendo HA funcionalizada com ácido acrílico apresentou os melhores resultados para resistência à flexão, provavelmente em decorrência da co-polimerização dos monômeros da matriz resinosa com os grupos acrilato (13-15).

Recentemente, foi descrita a síntese e caracterização de partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) sintetizadas na presença de dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) (16). Dentre as diversas fases do ortofosfato de cálcio, o DCPD apresenta potencial para ser utilizado como carga bioativa em materiais resinosos odontológicos pois é uma das mais solúveis, o que facilitaria a liberação de íons (17). Adicionalmente, seu índice de refração (1,54 – 1,55) é semelhante ao do vidro de bário (1,53) utilizado como fase de reforço em materiais comerciais (18,

19). O TEGDMA é um monômero dimetacrilato levemente hidrofílico devido à presença de grupos éter em sua estrutura (20), comumente empregado em compósitos comerciais e foi utilizado como funcionalizante por se apresentar como um ácido fraco, capaz de se unir ao cálcio das partículas de DCPD em crescimento através de ligações íon-dipolo através dos átomos de oxigênio do seu grupo espaçador (16). De fato, aumentos significativos na resistência à flexão de compósitos contendo partículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA foram observados em comparação ao material controle contendo partículas não funcionalizadas, sem comprometer a liberação de íons (21).

Outros derivados do dimetacrilato de etileno glicol (etileno glicol dimetacrilato/EGDMA, dietileno glicol dimetacrilato/DEGDMA e tetraetileno glicol dimetacrilato/TETDMA) foram avaliados como agentes funcionalizantes, adicionados a uma das soluções precursoras no momento da síntese. Os resultados mostraram que a área superficial das partículas aumentou de 36 m²/g (DCPD não funcionalizado) para 66 m²/g nas partículas funcionalizadas com DEGDMA. Como comparação, a funcionalização com TEGDMA resultou numa área de superfície de 55 m²/g. Entretanto, o tamanho das partículas não foi significativamente reduzido pela funcionalização (não-funcionalizado: 25 µm, DEGDMA: 12 - 20 µm, TEGDMA: 19 - 20 µm) (22).

Conforme descrito anteriormente, o ácido acrílico mostrou bons resultados como funcionalizante de partículas de hidroxiapatita. Nesses estudos, porém, a liberação de íons não foi determinada, uma vez que o objetivo dos autores foi avaliar o uso da HA como fase de reforço. É possível que os bons resultados estejam relacionados à redução da aglomeração resultante da repulsão eletrostática provocada pela presença de grupos carboxílicos ionizados durante a síntese (23). Semelhante aos ácidos carboxílicos, monômeros contendo grupos de ácido fosfórico (H₂PO₄⁻ ou HPO₄²⁻) apresentam sítios carregados negativamente, os quais têm afinidade pelo Ca²⁺ e poderiam se unir quimicamente ao cálcio. O fosfato de metacriloiloxietila (MOEP) apresenta um grupo de ácido fosfórico e um metacrilato em sua estrutura. Semelhante ao ácido acrílico, espera-se que esta molécula apresente interação química com o cálcio e co-polymerize com os monômeros da matriz resinosa do compósito.

Frente ao exposto, o presente estudo tem o propósito de sintetizar partículas de DCPD funcionalizadas *ab initio* com ácidos carboxílicos (ácido cítrico e ácido

acrílico), MOEP e DEGDMA. A funcionalização *ab initio* ocorre concomitante à precipitação e nucleação dos cristais de DCPD, favorecendo uma interação química mais efetiva entre os funcionalizantes e as partículas, além de possivelmente afetar seu tamanho e morfologia devido ao excesso de cargas elétricas (no caso dos monômeros ácidos) e ao fato destes monômeros atuarem como co-solventes, modificando a tensão superficial do meio reacional (24). O propósito da funcionalização é a obtenção de partículas de DCPD com maior área superficial, menor tamanho e capazes de co-polimerizarem com a matriz resinosa. Com isso, as propriedades mecânicas dos compósitos formulados com estas partículas seriam superiores em relação às aquelas apresentadas por um material contendo partículas não funcionalizadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FOSFATOS DE CÁLCIO EM ODONTOLOGIA RESTAURADORA

Por serem os constituintes principais da fase mineral dos tecidos duros (ossos e dentes) e devido a sua biocompatibilidade, os fosfatos de cálcio (CaP) apresentam grande interesse em odontologia e medicina (25-27). Quimicamente, esses compostos são constituídos por três elementos principais: cálcio (estado de oxidação +2), fósforo (estado de oxidação +5) e oxigênio (estado de redução -2). O íon hidrogênio também se encontra presente na composição química de muitos fosfatos de cálcio, seja como água incorporada (exemplo: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hidróxido (exemplo: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ou como constituinte de um ânion ácido (HPO_4^{2-} ou H_2PO_4^-). Os compostos resultantes da combinação desses elementos podem ser diferenciados de acordo com o tipo de ânion fosfato em orto- (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- ou PO_4^{3-}), meta- (PO_3^-), piro- ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) e poly- [$(\text{PO}_3)_n^n$] (28).

A hidroxiapatita é um dos ortofosfatos de cálcio mais estudados em odontologia pelo fato de ser o principal constituinte da fase inorgânica do esmalte dentário (29, 30). Devido à sua elevada razão Ca/P (1,67), a HA é o ortofosfato de cálcio mais estável em meio aquoso (menos solúvel) (31). No campo da odontologia preventiva e restauradora, as partículas de HA foram testadas quanto ao seu efeito sobre as propriedades mecânicas de materiais restauradores intermediários (32, 33), cimentos de ionômero de vidro (34, 35), compósitos e adesivos bioativos (14, 36) e quanto ao seu potencial remineralizador quando adicionadas a dentifrícios (37, 38).

Outras fases de CaP vêm sendo investigadas no desenvolvimento de materiais restauradores com ação remineralizante. O fosfato de cálcio amorfo (ACP) é possivelmente a fase mais extensivamente pesquisadas em compósitos experimentais e sistemas adesivos (39-43). Comercialmente, partículas de ACP podem ser encontradas em selantes resinosos (Aegis Pit & Fissure with ACP, Bosworth Co, Skokie, IL, USA), cimentos ortodônticos (Aegis Ortho, Bosworth Co), compósitos restauradores (Aegis V, Bosworth Co), agentes clareadores (Philips Zoom DayWhite e NiteWhite, Philips, Amsterdã, NDL) e dentifrícios (ACP Enamelon, Enamelon Inc., Cranbury, NJ). O potencial remineralizador das partículas de ACP

está vinculado à sua alta solubilidade (44). Todavia, o ACP tem a tendência de se converter em fases cristalinas termodinamicamente mais estáveis (portanto, com menor solubilidade), como a hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) ou fluorapatita (FA) (27, 45). De forma a evitar a conversão espontânea de ACP em HA e não comprometer a liberação de íons, é necessário estabilizar as partículas associando-as a compostos como o pirofosfato ($P_2O_7^{4-}$) (39, 44, 46, 47) ou o fosfopeptídeo da caseína do leite (CPP), que forma o complexo conhecido como CPP-ACP (45, 48, 49).

Outras fases de CaP testadas como constituintes da fase inorgânica de materiais resinosos são o fosfato de cálcio anidro (DCPA) (12, 50), fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) (6, 21, 22, 24), fosfato tetracálcico (TTCP) (5) e fosfato tri-cálcico (TCP) (51). Dentre elas, o DCPD possui índice de refração (1,54 - 1,55) similar ao do vidro de bário (1,53) utilizado como partícula de reforço em materiais comerciais (18). Isso garante que a transmissão de luz durante a fotopolimerização do compósito não seja afetada. O cristal de DCPD é formado por cadeias de $CaPO_4$ arranjadas paralelamente umas às outras, com moléculas de água interpostas (31). A presença das moléculas de água estruturais e a razão Ca/P relativamente baixa (Ca/P=1) fornece ao DCPD solubilidade intermediária entre as fases cristalinas do CaP (17), característica desejável em partículas liberadoras de íons (35, 42).

2.2 REMINERALIZAÇÃO

Remineralização pode ser definida como o processo no qual íons cálcio e fósforo provenientes de uma fonte externa são fornecidos à estrutura dental, resultando em um ganho mineral (45). Embora a remineralização do esmalte seja previsivelmente alcançada, a remineralização da dentina ainda é um desafio (52-54). A estrutura da dentina é heterogênea e complexa, e sua remineralização efetiva (envolvendo não apenas aumento no conteúdo mineral, mas também a recuperação de suas propriedades mecânicas) requer que a deposição mineral ocorra no espaços intra e interfibrilares do colágeno, e não apenas externamente às fibras. O sucesso relatado com o uso de biomateriais capazes de liberar de íons de cálcio e fósforo também está vinculado ao crescimento epitaxial de sais de fosfato de cálcio

depositados sobre sítios de nucleação remanescentes na superfície do colágeno dentinário ou sobre prismas de esmalte (55). O crescimento epitaxial é considerado uma abordagem “top-down”, de acordo com a teoria clássica de cristalização (56, 57). Em contrapartida, a remineralização dita “biomimética” (também denominada remineralização “bottom-up”) representa um tipo de abordagem de “cristalização não clássica”, a qual independe de sítios de nucleação pré-existentes. Esse conceito se baseia na transferência de agregados nanométricos de ACP formados ao longo da cadeia orgânica de análogos biomiméticos de proteínas não-colágenas que são “carregados” para os espaços intra e interfibrilares do colágeno desmineralizado e se depositam a partir das regiões mais profundas da região desmineralizada (58-60).

Na literatura é possível encontrar estudos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* avaliando a remineralização dos tecidos dentários com a utilização de materiais contendo partículas de CaP. Apesar de suas limitações em relação à reprodução das condições intrabuciais, os experimentos *in vitro* são mais comumente utilizados devido à sua facilidade de realização e padronização. Um estudo *in vitro* realizado com dentes humanos avaliou a remineralização de dentina a partir da utilização dois tipos de cimentos resinosos (cimento I: 18% em massa de TTCP e 55% em massa de DCPA; cimento II: 20% em massa de TTCP e 60% em massa de DCPA). Após seis semanas de envelhecimento em saliva artificial, a avaliação microradiográfica comprovou aumentos no conteúdo mineral das lesões de 47% e 38% para o cimento I e II, respectivamente (2). Entretanto, as porcentagens de remineralização devem ser avaliadas com cautela uma vez que não foi aplicada uma camada de adesivo entre a dentina e a restauração. Quando o mesmo estudo foi reproduzido interpondo-se uma camada de adesivo entre a dentina e o cimento, a porcentagem de remineralização foi reduzida a menos da metade (23% a 13%, respectivamente para os cimentos I e II) (3).

Outros grupos vêm pesquisando o uso de nanopartículas de ACP (NACP) em materiais restauradores resinosos. Em um estudo recente, compósitos experimentais contendo 40% de NACP e 20% de vidro silanizado ou 40% de NACP e 20% de TTCP (porcentagens em peso) foram aplicados diretamente sobre dentina desmineralizada e os corpos de prova foram submetidos a ciclagem de pH desmineralizante (DES/RE) por quatro ou oito semanas. De forma geral, a remineralização aumentou de quatro para oito semanas, mas não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois materiais experimentais. Ambos

apresentaram porcentagens de remineralização superiores e estatisticamente significantes (NACP: $48,2 \pm 11\%$, NACP-TTCP: $43,2 \pm 12,6\%$) em relação a um compósito comercial sem CaP ($5,0 \pm 7,2\%$) (61).

A associação de NACP com moléculas orgânicas usadas como precursores biomiméticos também foi testada. Após o tratamento da dentina desmineralizada com solução de poliamidoamina (PAMAM), um compósito experimental formulado com 40% de NACP e 20% de vidros de bário (em peso) foi aplicado sobre essa superfície. Após imersão em solução salina acidificada com ácido láctico (pH 4) por 21 dias, foi observada deposição mineral nos túbulos dentinários e recuperação da microdureza em níveis semelhantes aos da dentina sadia (62).

A remineralização do esmalte também é relatada em estudos *in vitro*. Um compósito contendo 40% em peso de ACP estabilizado com pirofosfato foi colocado em contato com lesões sub superficiais em esmalte produzidas artificialmente em dentes bovinos. Após 14 dias de ciclagem DES/RE, o material contendo ACP foi capaz de promover ganho mineral de até 38% enquanto os compósitos controle formulados com hidroxiapatita ou sílica apresentaram pequena perda mineral (6 - 9%) (1). Em comparação com materiais liberadores de flúor, um compósito resinoso para uso ortodôntico com 40% em peso de ACP apresentou maior recuperação mineral em lesões artificiais em esmalte do que um cimento ortodôntico adesivo contendo flúor (14,4% versus 4,4%, respectivamente). Ademais, enquanto o cimento ortodôntico contendo flúor propiciou maior ganho mineral nas camadas superficiais (primeiros 25 μm até 50 μm) da lesão, o compósito contendo ACP apresentou remineralização em regiões mais profundas (50 μm a 125 μm) (40).

Em comparação aos modelos experimentais *in vitro*, estudos *in situ* são muito mais representativos, pois expõem os materiais avaliados a condições muito próximas ao uso clínico pretendido, incluindo a presença de biofilme, variações térmicas e fluxo salivar. Um desses estudos verificou o efeito protetor de um compósito contendo 40% de ACP e 20% de vidros silanizados (em peso) sobre o esmalte adjacente à restauração. Após 14 dias na presença de biofilme cariogênico, a perda mineral na interface esmalte/restauração foi cerca de um terço daquela observada ao redor do material controle e a profundidade da lesão foi reduzida em 45% (41). Um selante de fósulas e fissuras comercial contendo ACP (Aegis) foi aplicado sobre lesões artificiais de esmalte em dentes bovinos e avaliado após 5

dias *in situ*. Foi observado um aumento na microdureza superficial do grupo teste em relação a amostras com esmalte exposto (grupo controle) (63).

Estudos *in vivo* envolvendo materiais resinosos contendo partículas de ortofosfato de cálcio são, infelizmente, escassos. Um estudo avaliou um cimento resinoso formulado com 29,1% de DCPA e 36,8% de TTCP (porcentagens em peso) aplicado sobre dentina afetada por cárie (após remoção seletiva da dentina infectada). Após três meses, os dentes foram extraídos e os conteúdos de cálcio e fosfato foram quantificados. A dentina que recebeu o cimento com CaP recuperou seu conteúdo mineral em níveis compatíveis aos da dentina sadia e estatisticamente superiores aos valores registrados no grupo controle negativo (sem a aplicação do cimento) (65). Outro estudo *in vivo* avaliou o uso de um cimento ortodôntico com ACP (Aegis Ortho) na colagem de bráquetes em pré-molares agendados para extração após 30 dias. Quando avaliado em até 20µm de profundidade, o esmalte dos dentes com bráquetes colados utilizando o cimento com ACP apresentou valores médios de microdureza transversal 52% maiores em relação ao que tiveram bráquetes colados com resina convencional (Concise 3M Dental Products, St Paul, MN, USA) (64).

2.3 LIBERAÇÃO DE ÍONS

Diversos fatores interagem para determinar as concentrações de íons de cálcio e fosfato liberados por materiais resinosos. O aumento do conteúdo de partículas de CaP em um material está vinculado com maior liberação de íons, independentemente da fase ou do tamanho das partículas de CaP utilizadas. Entretanto, a relação entre conteúdo de partículas e liberação de íons não é linear (39). Isso decorre do fato de que o aumento da fração de partículas de CaP não somente aumenta a fonte de íons, mas também promove um aumento das interfaces no interior do compósito, o que facilita a penetração da água no material e a saída dos íons do seu interior (66).

A área superficial também influencia na liberação de íons. A comparação de compósitos contendo partículas de DCPA com diferentes tamanhos (DCPA: 50-200 nm; DCPA moído: 0,1 – 2 µm; DCPA: 1 – 60µm) mostrou que o

material formulado com a partícula de maior área superficial (menor tamanho) resultou em uma maior liberação de íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} após 56 dias, quando comparado com os compósitos com partículas maiores (12). A presença de monômeros hidrofílicos na matriz resinosa, como 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) ou a utilização de monômeros-base com menor capacidade de reticulação, como o dimetacrilato etoxilado de bisfenol A (EBPADMA), permitem maior trânsito de fluídos no interior do compósito facilitando a liberação de íons (1, 2, 40, 67).

O pH do meio de imersão também interfere com as concentrações iônicas liberadas por materiais resinosos contendo partículas de CaP. Concentrações iônicas muito mais altas são liberadas e estão disponíveis para remineralização nos casos de desafio acidogênico e/ou em pH abaixo de pH 5,5. A maior liberação pode ser explicada como decorrência de uma maior erosão das partículas em meio ácido, e também foi observada em cimentos de ionômero de vidro (68). É interessante observar que as propriedades mecânicas do material não são prejudicadas e mantêm-se comparáveis àquelas de espécimes mantidos em pH neutro (5, 7). A liberação de íons por materiais resinosos contendo partículas de CaP segue um padrão semelhante ao descrito para cimentos de ionômero de vidro, com concentrações mais elevadas sendo liberadas nos primeiros dias (68) seguido de reduções nas semanas subsequentes (7). Um estudo envolvendo um compósito com 20% em massa de NACP mostrou que em meio ácido (pH 4) a liberação de íons cessa em torno de cinco a seis semanas (69).

Poucos trabalhos correlacionaram a liberação de íons de compósitos bioativos com valores de remineralização. Em um deles foi observado que a liberação de íons acumulada ao longo de 90 dias em saliva artificial foi de aproximadamente 0,8 a 1,25 mmol/L para Ca^{2+} e 0,25 a 0,60 mmol/L para HPO_4^{2-} , correspondendo a uma recuperação do conteúdo mineral da dentina de 47% (2). Em outro estudo, a utilização de 40% em peso de ACP resultou em liberações acumuladas após 28 dias de armazenamento de cerca de 0,74 mmol/L de Ca^{2+} e 0,54 mmol/L de HPO_4^{2-} , as quais promoveram a uma remineralização em esmalte da ordem de 14% (40).

Além de possibilitarem a deposição de minerais, os íons fosfato liberados por algumas fases do CaP são capazes de neutralizar ácidos produzidos por bactérias. Isso acontece porque os ânions dos ortofosfatos (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- e PO_4^{3-}) formam bons tampões químicos, pois são capazes de se ligar de forma reversível aos íons H^+ presentes na solução. Um compósito contendo 40% em massa de ACP foi capaz

de elevar o pH do meio de 4,0 para 5,7 no decorrer de 10 minutos e até 6,8 após 90 minutos. Além disso, devido à menor acidez do meio, o crescimento de *Streptococcus mutans* sobre os compósitos contendo ACP foi significativamente menor em relação ao compósito comercial (controle) (70). Entretanto, é importante destacar que estes materiais não apresentam ação antimicrobiana, conforme verificado no estudo *in situ* mencionado previamente, no qual não foram detectadas diferenças no número de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus* totais, *Streptococcus Mutans* e *Lactobacillus* nos biofilmes formados sobre um compósitos bioativo e um compósito comercial (41).

2.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Partículas de CaP não apresentam função de reforço devido à ausência de interação química e micromecânica com a matriz resinosa o que não permite uma distribuição efetiva das tensões geradas no material. Consequentemente, a concentração de tensões favorece o surgimento de trincas que podem levar à fratura do material (6, 39). Adicionalmente, como os íons liberados são provenientes da dissolução superficial das partículas de CaP, esses materiais apresentam uma degradação mais acentuada em água do que compósitos convencionais (24). O trânsito de fluídos no interior do material é facilitado em decorrência da falta de união entre as partículas de CaP e a matriz orgânica, o que contribui para a maior degradação.

A princípio, devido a suas propriedades mecânicas inferiores às apresentadas por compósitos convencionais, materiais resinosos contendo partículas de CaP estariam indicados para aplicações clínicas que requerem baixa solicitação mecânica, como forramento (71), colagem de bráquetes ortodônticos (40, 72), selantes de superfície ou cimentos endodônticos (73). Algumas propostas foram elaboradas visando o aprimoramento as propriedades mecânicas desses materiais a fim de ampliar suas indicações com restauradores diretos em áreas expostas a maiores cargas oclusais. Uma delas é a utilização de partículas com tamanho nanométrico (74), o que promoveria uma distribuição mais homogênea e redução dos defeitos na rede polimérica. Sendo assim, a concentração tensões na interface

DCPD/matriz e a propagação de trincas são minimizadas (22). Uma segunda proposta que apresenta maior influência sobre as propriedades mecânicas é a incorporação de partículas de reforço as partículas de CaP na fase inorgânica dos materiais (5). Um primeiro estudo testou *whiskers* de carbeto de silício com sílica incorporada como material de reforço associado a DCPA. A adição dos *whiskers* aprimorou as propriedades mecânicas e não comprometeu a liberação de íons, entretanto o material era muito opaco o que impedia fotoativação (75).

Partículas de vidro de borossilicato de alumínio são geralmente utilizadas em compósitos comerciais e também foram testadas como partículas de reforço em compósitos bioativos. A incorporação de 30% em massa de vidros a um compósito formulado com 40% em massa de TTCP resultou em aumento estatisticamente significativo na resistência à flexão, da ordem de 83%, em relação ao material formulado sem vidros. O módulo de elasticidade também apresentou aumento de 2 GPa para 11 GPa após a incorporação dos vidros ao biomaterial (5). Outros estudos também compararam compósitos contendo CaP e vidros com compósitos comerciais. Materiais contendo até 40% em massa de NACP e 20% em massa de vidros apresentaram resistência à flexão similar a de um compósito comercial microparticulado (10, 62). Um estudo recente mostrou que um compósito contendo 10% em volume de DCPD associado a 50% em volume de vidros apresenta valores de resistência à flexão e módulo de elasticidade semelhantes ao de um compósito microhíbrido (24).

2.5 FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE CaP

A modificação da superfície das partículas de CaP representa uma alternativa para aumentar as propriedades mecânicas de compósitos contendo fosfatos de cálcio. A funcionalização de partículas de fosfato de cálcio pode ser realizada misturando-as ao composto a ser adsorvido na superfície, como acontece na silanização (12, 47, 76, 77). Uma outra abordagem é denominada funcionalização *ab initio*, na qual o composto orgânico é adicionado a uma das soluções precursoras e a funcionalização ocorre concomitantemente à formação da partícula (16, 21, 24, 47). Dependendo das características do agente funcionalizante, sua presença pode

alterar a morfologia e tamanho das partículas, bem como inibir a coalescência das partículas primárias (agregação) e a aglomeração.

Compostos silânicos, como o metacriloxipropiltrimetoxisilano (MPTMS), foram avaliados na funcionalização de partículas de CaP (11, 12). O silano é uma molécula bifuncional capaz de se unir à superfície das partículas por meio dos grupos silanol, formando ligações Si-O-Si e de se copolimerizar com matriz orgânica do compósito (76). Materiais contendo 60% a 67% em massa de HA silanizada apresentaram resistência à flexão biaxial até 52% superiores ao controle contendo partículas não silanizadas. Outras propriedades como resistência à tração diametral e dureza também foram melhoradas com a silanização (11). Entretanto, devido à natureza hidrofóbica do silano, o acesso da água à partícula é comprometido e, com isso, a liberação de íons cálcio foi reduzida em até 50% (12).

Recentemente, foi descrita a funcionalização *ab initio* de partículas de DCPD com dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) (16). O mecanismo de interação do TEGDMA com as partículas de CaP envolve uma ligação íon-dipolo entre o cálcio presente no DCPD e átomos oxigênio presentes nos grupos oxietileno do TEGDMA. Apesar de não ter reduzido o tamanho das partículas de DCPD (medianas entre 17-20 μm) (16), a funcionalização com TEGDMA aumentou a resistência à fratura do compósito (21). Pelo fato do TEGDMA não envolver toda a partícula de DCPD e devido a sua relativa hidrofilia, a liberação de íons não é afetada (24).

Outros derivados do dimetacrilato de etileno glicol (EGDMA) foram recentemente testados na funcionalização *ab initio* de partículas de DCPD. Dentre os compostos avaliados (EGDMA, dimetacrilato de dietilenoglicol/DEGDMA, TEGDMA e dimetacrilato de tetraetileno glicol/TETDMA), as partículas funcionalizadas com DEGDMA apresentaram maior área superficial. Compósitos contendo 15% em volume das partículas de DCPD funcionalizadas com DEGDMA associados a 45% em volume de vidros apresentaram resistência à flexão biaxial 39% maior do que o compósito contendo partículas de DCPD não funcionalizadas (78).

Ácidos carboxílicos como ácido metacrílico, acrílico e cítrico foram avaliados como agentes funcionalizantes em partículas de HA (13-15, 79). Dentre esses funcionalizantes, o ácido acrílico e o ácido metacrílico apresentam um grupo vinila em sua estrutura e, portanto, são capazes de co-polimerizar com a matriz resinosa. Materiais formulados com matrizes orgânicas compostas por BisGMA/TEGDMA ou

BisGMA/HEMA e 60% em massa de partículas de HA funcionalizadas com ácidos carboxílicos obtiveram maiores valores para módulo de elasticidade e resistência à flexão em comparação ao material que possuía a mesma porcentagem de HA não funcionalizada. Adicionalmente, o material contendo partículas de HA funcionalizadas com ácido acrílico apresentou resistência à flexão semelhante ao do material sem carga (BisGMA/TEGDMA) (13) e propriedades flexurais semelhantes a um material que possuía partículas de HA silanizadas (15). Porém, nestes estudos a liberação de íons não foi avaliada.

O ácido cítrico apresenta três grupos carboxílicos ionizáveis, os quais conseguem se unir aos íons cálcio presentes na superfície da HA, produzindo camadas carregadas negativamente na superfície do cristal em crescimento. Isso gera interações repulsivas com os ânions fosfato, inibindo o crescimento do cristal (23). A inibição do crescimento cristalino também pode ser explicada pela redução da energia interfacial quando os íons citrato são adsorvidos nos cristais de HA (23).

O fosfato de metacriloiloxietila (MOEP) é um monômero metacrilato que contém um grupamento terminal fosfato. Este grupo fosfato pode sofrer dissociação em solução e, com isso, atrair íons cálcio e propiciar a nucleação de cristais de CaP (80, 81). Além disso, por apresentar um radical metacrilato, é passível de copolimerização com os monômeros da matriz resinosa. Este monômero foi avaliado em relação a sua capacidade de modificar diferentes substratos por copolimerização com outros polímeros biocompatíveis, a fim de aumentar a deposição de cálcio em suas superfícies (81). Esta elevada afinidade com o cálcio ainda não foi avaliada na funcionalização de partículas de CaP.

Frente ao exposto, o potencial remineralizador de materiais resinosos contendo CaP é evidente. No entanto, existem limitações no que se refere às suas propriedades mecânicas. Uma abordagem interessante para minimizar o efeito negativo destas partículas sobre estas propriedades é funcionalizá-las. O objetivo é obtenção de partículas com menor tamanho, maior área superficial e capacidade de união química à matriz resinosa. Deve ser ressaltado que a escolha do agente funcionalizante deve levar em consideração seu efeito sobre a liberação de íons, a fim de não comprometer o potencial remineralizador destes materiais.

3 PROPOSIÇÃO

Como base no exposto, o presente estudo teve como objetivos:

- Sintetizar e caracterizar partículas de DCPD não funcionalizadas e funcionalizadas com ácido cítrico, ácido acrílico, MOEP e DEGDMA. A hipótese de trabalho foi que através da funcionalização *ab initio* seria possível a obtenção partículas menores e com maior área superficial em relação a partículas não-funcionalizadas. Além disso, partículas de DCPD funcionalizadas com ácido acrílico, MOEP ou DEGDMA teriam o potencial de minimizar o efeito negativo que a incorporação de partículas de ortofosfato de cálcio apresentam sobre as propriedades mecânicas de materiais resinosos.

- Avaliar o efeito da adição de partículas de DCPD (funcionalizadas ou não funcionalizadas) em uma matriz resinosa à base de dimetacrilatos quanto ao grau de conversão, resistência à flexão biaxial e módulo flexural (inicial e após 60 dias em água). Foi testada a hipótese nula que o desempenho dos compósitos experimentais não seria influenciado pela substituição de parte das partículas de reforço por DCPD.

- Avaliar o efeito da funcionalização das partículas sobre a liberação de íons de compósitos resinosos contendo DCPD e o efeito protetor destes materiais sobre o esmalte exposto a um desafio cariogênico. Foi testada a hipótese nula que a funcionalização das partículas não influenciaria o desempenho dos compósitos experimentais nas variáveis avaliadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DE PARTÍCULAS DE FOSFATO DE DICÁLCICO DIHIDRATADO FUNCIONALIZADAS

A síntese do fosfato dicálcico dihidratado (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foi realizada por co-precipitação (16), no qual 87 ml de uma solução contendo 1 mol/L de nitrato de cálcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, foi gotejada por meio de uma bomba peristáltica (9 ml/min) ao mesmo volume de uma solução de fosfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, na mesma concentração (todos os químicos adquiridos da Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA). Previamente à mistura das duas soluções, foi acrescentado à solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ um dos quatro compostos funcionalizantes: ácido cítrico, ácido acrílico, DEGDMA ou MOEP (Figura 4.1). As concentrações de funcionalizante utilizadas nas diferentes sínteses foram 0,3 mol/L para o ácido cítrico, 0,1 mol/L para o ácido acrílico e o MOEP e 1 mol/L para o DEGDMA. As concentrações dos monômeros ácidos foram definidas com base em estudos preliminares e na referência (23). A concentração de DEGDMA foi definida com base em um estudo anterior (78). Adicionalmente, foi realizada a síntese sem a adição de agentes funcionalizantes para a obtenção de partículas utilizadas como controle.

O pH da solução receptora de fosfato de amônio foi monitorado em intervalos de 30 minutos a partir do final do gotejamento até o final do período de 3 horas. A suspensão de partículas foi mantida sob agitação magnética. Após 30 minutos de decantação, o sobrenadante foi removido e iniciou-se uma série de cinco ciclos de lavagem do precipitado para a remoção do subproduto da reação (nitrato de amônio, NH_4NO_3) e do excesso de funcionalizante. A lavagem consistiu na adição água destilada ao precipitado e agitação da mistura em um agitador do tipo Vertex por 3 minutos (Phoenix Industria e comércio de equipamentos científicos, modelo AT56, Araraquara, SP), seguido de ultracentrifugação (3000 RPM) a -4°C (Thermo Fisher Scientific, modelo Sorvall RC 6 Plus, Asheville, NC, EUA) por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante era removido e iniciava-se um novo ciclo de lavagem. Ao final do quinto ciclo, o precipitado foi congelado a -80°C e liofilizado (VirTis, SP

Industries Company, modelo Benchtop, Gardiner, NY, EUA) até a obtenção de um pó branco.

Figura 4.1 - Fórmulas estruturais do ácido cítrico, ácido acrílico, dimetacrilato de dietilenoglicol (DEGDMA) e fosfato de metacrilóioxietila (MOEP), utilizados na funcionalização das partículas de fosfato dicálcico diidratado (DCPD)

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

4.2.1 Difração de raio X

A difração de raio X foi realizada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Essa análise tem como objetivo identificar a fase de ortofosfato de cálcio obtida na síntese. A difratometria de raios X foi feita com radiação CuK α com filtro de níquel sob 40 kV e 30 mA em um equipamento com geometria $\theta/2\theta$ (MultiFlex, Rigaku Corp., Tóquio, Japão). As leituras foram feitas de forma contínua entre os ângulos de 10° a 60°, com intervalos de 0,05° e 10 segundos por intervalo.

4.2.2 Análise elementar

A análise elementar foi realizada no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Essa análise é empregada para a determinação do teor de funcionalizante ao redor das partículas. O teor de carbono foi determinado através de absorção por infravermelho utilizando-se o analisador CS-400 (LECO Corporation, St. Joseph, Michigan, EUA). A resolução do teste é de 2 µg de carbono/grama de amostra (precisão de $\pm 10\%$).

Aproximadamente 1 g de material foi inserido em um cadinho junto a uma amostra de tungstênio adicionada como material de aceleração. Após a purga para remoção dos gases atmosféricos residuais, o fluxo de oxigênio foi restaurado e o forno de indução ligado. O ambiente de oxigênio puro e o calor provocam a combustão da amostra e oxidação de todos os seus elementos. O teor de carbono resultante da queima da amostra que se ligou ao oxigênio para formar CO ou CO₂ foi medido em células de infra-vermelho (82, 83).

4.2.3 Densidade teórica

A densidade teórica das partículas foi determinada em um picnômetro a hélio (Ultrapyc 1200e, Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, EUA). Os valores de densidade dos pós foram calculados através da média aritmética de três leituras, utilizando uma amostra com aproximadamente 1 g. As análises foram realizadas em temperatura ambiente (23°C). Após um período de purga (10 minutos) para remoção de gases adsorvidos na superfície das partículas, foi iniciada a injeção de gás hélio até a pressão máxima de 14 psi no compartimento de amostra. O volume da amostra foi calculado pela diferença entre o volume nominal do compartimento e o volume de gás hélio que efetivamente foi utilizado para preenchê-lo. Em seguida, a densidade da amostra foi calculada utilizando-se o seu valor de massa, previamente determinada com precisão de 0,001 g.

4.2.4 Área superficial (método BET)

A análise da área superficial das partículas foi realizada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). A área superficial específica dos materiais foi determinada a partir das isotermas de adsorção de nitrogênio e método “single point BET” (Brunauer, Emmett e Teller) (84) com o auxílio do software NOVAWin (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, EUA). Previamente à análise, as partículas funcionalizadas foram submetidas a cinco ciclos de lavagem com acetona para completa remoção dos funcionalizantes, a fim de permitir a análise da área superficial correspondente à porção inorgânica, sem interferência da camada orgânica.

4.2.5 Espalhamento de luz laser

A distribuição de tamanhos das partículas foi determinada através da técnica de espalhamento de luz laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido), realizada no Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (LCT, Poli-USP). Previamente à análise, o pó foi disperso em álcool isopropílico por 1 minuto em ultrassom e em seguida injetado no equipamento para leitura.

4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

A micromorfologia das partículas foi observada através de microscopia eletrônica de varredura (Field Emission, modelo JSM- 6701F, JEOL Ltd., Japão), realizada no Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (LCT, Poli-USP).

4.2.7 Potencial zeta

A intensidade das cargas elétricas na superfície das partículas foi realizada utilizando-se um analisador de potencial zeta. Suspensões das diferentes partículas foram preparadas adicionando 0,02 gramas das partículas de DCPD em 40 ml de KCl (0,01 mol/L). O pH das soluções foi mantido a 7,4 pela adição de 0,01 mol/L (HCl) e/ou 0,01 mol/L (NaOH). Foram realizadas 30 varreduras e calculado o valor médio.

4.3 MANIPULAÇÃO DOS MATERIAIS RESINOSOS

Seis compósitos experimentais foram manipulados, com sua matriz orgânica constituída por dimetacrilato de glicidila bisfenol-A (BisGMA) e dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) na proporção de 1:1 em mols, 0,5% em peso de canforoquinona e 0,5% em peso de benzoato de 4-dimetilamino de etila (EDMAB) como fotoiniciadores (todos os compostos da Sigma–Aldrich). A fração volumétrica total de carga dos compósitos foi definida em 60%. Além do compósito controle contendo apenas partículas de vidro de bário silanizadas (mediana: 2 μm), foram manipulados outros cinco compósitos contendo 40% de partículas de vidro e 20% de partículas de DCPD. Os compostos foram pesados com auxílio de uma balança analítica com precisão de 0,1 mg (Mettler Toledo XS105 Dual Range, Columbus, OH, EUA), misturados mecanicamente a vácuo (Speedmixer DAC 150.1 FVZ-K, FlackTek Inc., Landrum, SC, EUA) e mantidos sob refrigeração até duas horas antes de sua utilização.

4.4 GRAU DE CONVERSÃO

O grau de conversão (GC) dos materiais foi determinado 24 horas após a fotoativação através de espectroscopia no infra-vermelho próximo (Vertex 70; Bruker

Optik GmbH, Ettlingen, Alemanha). Os corpos de prova (n=3) foram confeccionados com auxílio de uma matriz de silicone, a qual foi prensada entre duas lâminas de vidro até atingir a espessura de 1 mm. Após a polimerização do silicone, foi feito um orifício no centro da matriz com 7 mm diâmetro no qual o compósito foi inserido e prensado entre as lâminas de vidro. O espectro do material não-polimerizado no intervalo de comprimentos entre 4000 cm⁻¹ e 9840 cm⁻¹ foi obtido pela co-adição de 32 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹. Em seguida, o material foi fotoativado através da lâmina de vidro (Bluephase, Ivoclar-Vivadent, Schaan, Liechtenstein) recebendo 24 J/cm² (1200 mW/cm² por 20 segundos) e o conjunto armazenado em estufa a seco a 37°C. Após 24 horas, um novo espectro foi obtido. Com o auxílio do software Opus v.6 (Bruker Optics), a área sob a banda de absorção da ligação vinílica localizado a 6165 cm⁻¹ foi calculada. O grau de conversão foi calculado a partir da razão “polimerizado : não-polimerizado”, segundo a fórmula:

$$GC = \left(1 - \frac{pol}{npol}\right) \times 100$$

4.5 RESISTÊNCIA À FLEXÃO BIAxIAL E MÓDULO FLEXURAL

Para avaliação da resistência à flexão biaxial (RFB) e do módulo flexural (E) foram confeccionados corpos de prova em forma de disco com 12 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura utilizando uma matriz de aço bipartida. Após a inserção do compósito, uma tira de poliéster foi posicionada sobre a matriz a fim de tornar a superfície plana e mantê-la protegida do oxigênio. A fotoativação foi feita por 20 segundos em cada quadrante do corpo de prova utilizando o mesmo equipamento e os mesmos parâmetros descritos anteriormente. Uma lixa de granulação 600 foi utilizada para o acabamento das bordas dos discos. Para cada compósito, foram confeccionados 20 corpos de prova, sendo metade armazenada em água destilada por 24 horas e a outra metade por 60 dias, ambas a 37°C. Após o armazenamento, os discos foram fraturados em um dispositivo do tipo “pistão sobre três bolas”, posicionado em uma máquina de ensaios universal (modelo 5565, Instron Corp, Canton MA, EUA) (85). Os discos foram centralizados sobre três esferas de aço de

2,5 mm de diâmetro dispostas a 120° umas das outras em uma circunferência de 10 mm de diâmetro, com a face irradiada voltada para a aplicação de carga. A carga foi aplicada no centro do disco, com o uso de um pistão de extremidade plana e 1,2 mm de diâmetro. Um deflectômetro (modelo W-E401-E, Instron Corp., Norwood, MA, EUA) foi utilizado para monitorar a deformação do centro do disco (Figura 4.2). O ensaio foi realizado com taxa de carregamento de 0,5 mm/min. A resistência à flexão biaxial σ_{BI} , em MPa, foi calculada utilizando as seguintes fórmulas:

$$\sigma_{BI} = \frac{-0,2387P (X - Y)}{b^2}$$

$$X = (1 + \nu) \ln \left(\frac{r_2}{r_3} \right)^2 + \left[\left(\frac{1 - \nu}{2} \right) \right] \left(\frac{r_2}{r_3} \right)^2$$

$$Y = (1 + \nu) \left[1 + \ln \left(\frac{r_1}{r_3} \right)^2 \right] + (1 - \nu) \left(\frac{r_1}{r_3} \right)^2$$

onde P é a carga máxima de fratura (em N); b é a espessura do disco (em mm); ν é o coeficiente de Poisson; r_1 é o raio do círculo em que estão posicionadas as esferas de aço (5,0 mm); r_2 é o raio da ponta do pistão ou da área de aplicação da carga (0,6 mm); r_3 é o raio do disco (em mm). O coeficiente de Poisson adotado foi de 0,30 para todos os compósitos. Os valores de E , em GPa, foram calculados utilizando a equação abaixo:

$$E = \frac{\beta P a^2}{\omega h^3}$$

onde E é o módulo flexural (em GPa), β é uma constante relacionada à deflexão do disco na região central (0,509), P é a carga aplicada (em N), a é o raio do disco (em mm), ω é a deflexão no centro e h é a espessura do disco (em mm).

As superfícies de fratura foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 600 FEG, FEI, Hillsboro, Oregon, EUA).

Figura 4.2 - Montagem experimental utilizada para o ensaio de resistência à flexão biaxial, mostrando o dispositivo do tipo “pistão sobre três bolas” e a haste do deflectômetro posicionada junto à superfície inferior do corpo de prova. Imagem reproduzida da tese da aluna Marcela Charantola Rodrigues, DOI 10.11606/T.23.2014.tde-19022015-171637

4.6 LIBERAÇÃO DE ÍONS

Corpos-de-prova cilíndricos (5x1 mm, n=5) foram confeccionados e armazenados a 37°C por 24 horas a seco. Em seguida, foram imersos individualmente em solução de NaCl (133 mmol/L) tamponadas em pH 7 com solução HEPES (50 mmol/L) (5), mantendo-se constante a razão entre o volume do corpo de prova e solução em 3 mm³/ml (39). Os corpos de prova ficaram imersos por um período total de 60 dias e a cada 15 dias a solução foi coletada para a avaliação das concentrações de cálcio, fósforo e bário e os corpos de prova re-imersos em tubos falcon preenchidos com uma nova solução. As concentrações iônicas foram determinadas por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES 700, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA, Figura 4.3). Inicialmente, foram construídas curvas de calibração utilizando-se soluções-padrão (SpecSol Quimlab, Jacareí, SP, Brasil) diluídas para 0,5, 1, 1,5, 2,

4, 6, 8, 10, 12, 15, 17 e 20 ppm para o cálcio e 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 ppm para o fósforo. Previamente à análise, as soluções foram filtradas (tamanho do poro: 3 μm) e acidificadas com ácido nítrico (HNO_3) a 10% na proporção de 1:1. As leituras de cálcio e fósforo foram feitas separadamente, utilizando as emissões espectrais de 616 nm e 177 nm, respectivamente. Simultaneamente à leitura de fósforo, foi realizada a leitura de íons bário utilizando a emissão espectral de 614 nm. Os valores fornecidos pelo equipamento foram multiplicados por dois, para compensar o volume de ácido nítrico adicionado.

Figura 4.3 - Equipamento ICP-OES 700 (Agilent Technologies) utilizado nas análises de liberação de íons. Imagem reproduzida da tese da aluna Marcela Charantola Rodrigues, DOI 10.11606/T.23.2014.tde-19022015-171637

4.7 EFEITO PROTETOR SOBRE O ESMALTE SUBMETIDO A DESAFIO CARIOGÊNICO

4.7.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEUA), onde obteve a isenção de sua análise (Protocolo CEUA/FOUSP N° 014/2016), por se tratar de um estudo no qual foram utilizados dentes bovinos obtidos em frigorífico (ANEXO A).

4.7.2 Preparo dos espécimes e ciclagem

Blocos com 5 x 6 mm (n=60) foram obtidos utilizando-se um disco diamantado sob refrigeração (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) incluindo a região central da face vestibular dos incisivos bovinos. Os blocos foram fixados com cera em bases de resina acrílica e a superfície do esmalte foi planificada com o auxílio de uma politriz metalográfica utilizando lixas de granulação 600 e 1200, sob refrigeração (EcoMet 3000 e AutoMet 2000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). A espessura desgastada não ultrapassou dos 300 µm, sendo aferida com relógio comparador (Mitutoyo, No. 2119-50, Kanagawa, Japão). Após o polimento, a microdureza Knoop do esmalte em cada bloco foi determinada aplicando-se uma carga de 50 g por 10 s (HMV 2, Shimadzu, Japão). Cinco endentações foram realizadas e a média foi considerada como a dureza daquele bloco de esmalte. Os valores obtidos (317 ± 22) foram utilizados para distribuir os blocos nos grupos experimentais (n=10) por meio de amostragem aleatorizada estratificada (86).

Cavidades retangulares (5 mm x 2 mm x 2 mm) foram preparadas no centro do bloco de esmalte utilizando-se pontas diamantadas sob refrigeração (FG 837-016, Microdont, SP, Brasil). Em seguida, as paredes da cavidade foram condicionadas com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos (Condac 37, FGM, Joinville, SC) e o sistema adesivo (Single Bond Universal, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicado

de acordo com as instruções do fabricante. A fotoativação foi realizada utilizando-se um aparelho de LED por 20 s (Bluephase, Ivoclar-Vivadent). Em seguida, as cavidades foram restauradas em dois incrementos horizontais, cada um deles fotoativado por 20 s. Duas faixas de esmalte cosmético com aproximadamente um 1 mm de largura foram aplicadas nas margens do bloco perpendicularmente ao longo eixo da restauração a fim de serem utilizadas como controle do esmalte sadio.

Os espécimes foram submetidos a um modelo de ciclagem de pH desmineralizante, conforme descrito a seguir. As amostras foram imersas em solução desmineralizante (DES, 1,28 mmol/L de Ca, 0,74 mmol/L de P e 0,03 ppm F em tampão acetato 1,0 M, pH 5,0) durante 4 horas, respeitando-se a relação de 2,2 ml/mm² entre a superfície de esmalte exposto e o volume de solução (66 ml). Após a imersão em solução DES, os blocos foram lavados com água destilada e colocados em solução remineralizante (RE, 1,5 mmol/L de Ca, 0,9 mmol/L P, 150 mmol/L KCl, 0,1 M de Tris e 0,05 ppm F, pH 7,0) por um período de 20 horas, utilizando-se a relação de 1,1 ml/mm² (33 ml). O pH das soluções foi aferido antes e durante a ciclagem e, quando necessário, foi ajustado com HCl ou NaOH. A cada quatro dias, as soluções foram trocadas por soluções novas (87). Este procedimento foi repetido ao longo de 7 dias.

Ao final da ciclagem, as amostras foram lavadas e as leituras de microdureza superficial foram realizadas (50 g / 10 s). Nas regiões correspondentes ao esmalte controle e exposto foram feitas três linhas de endentações paralelas à interface dente/restauração nos dois lados da restauração, com cinco endentações em cada linha. A primeira linha foi posicionada a 50 µm da interface dente/restauração. Em uma mesma linha a distância entre as endentações foi de 100 µm.

Em seguida, os corpos de prova foram seccionados perpendicularmente ao longo eixo da restauração utilizando-se um disco diamantado e a superfície exposta foi polida com lixa de granulação 600, ambos os procedimentos sob refrigeração. A microdureza transversal do esmalte foi determinada a 10, 30, 50, 70 e 90 µm a partir da superfície externa do esmalte, tanto sob área controle quanto sob área exposta à ciclagem. Em cada profundidade foram feitas três endentações a uma distância de 50 µm uma da outra. A média das três endentações em uma mesma profundidade foi calculada (86). Os dados descritivos de microdureza superficial e transversal (KHN) para o esmalte controle e exposto encontram-se no (APÊNDICE A). As variações da microdureza superficial ($\Delta\text{KHN}_{\text{superficial}}$) em função do material

restaurador e da microdureza transversal ($\Delta KHN_{\text{transversal}}$) em função do material e da profundidade foram calculadas.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os conjuntos de dados foram submetidos ao teste de aderência à curva normal (teste de Levene) e de homogeneidade de variância (teste de Anderson-Darling). Os dados de grau de conversão e $\Delta KHN_{\text{superficial}}$, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator e teste de Tukey para contraste entre as médias. Dados de módulo flexural, liberação de íons e $\Delta KHN_{\text{transversal}}$, foram submetidos à ANOVA de dois fatores/teste de Tukey. Os dados de resistência à flexão biaxial foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para contraste de médias. Em todos os casos, foi adotado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

5.1.1 Difração de raio X

Os dados obtidos na análise por difração de raios X confirmaram a existência de estruturas cristalinas, com picos de máxima intensidade em 11,6°, 20,9°, 23,6°, 29,3°, 35,5° e 48°, característicos do DCPD (88). Nos difratogramas (Figura 5.1) foi possível observar que a funcionalização das partículas alterou a relação largura/meia altura dos picos característicos do DCPD, indicando que a presença do monômero funcionalizante no meio reacional diminuiu o tamanho do cristalito formado. Este efeito foi mais evidente para as partículas sintetizadas com ácido cítrico e MOEP.

Figura 5.1 - Difratomogramas das partículas de DCPD sintetizadas no estudo (“DCPD_Puro” se refere às partículas não-funcionalizadas)

5.1.2 Análise elementar, densidade teórica, área superficial, espalhamento de luz laser e potencial zeta

Os valores obtidos para análise elementar, densidade teórica, área superficial, distribuição de tamanho das partículas e potencial zeta são apresentados na tabela 5.1. A análise elementar revelou que apenas as partículas sintetizadas na presença de DEGDMA apresentaram retenção significativa do funcionalizante. Para as sínteses realizadas com ácido acrílico e MOEP, a porcentagem em peso de funcionalizante ficou abaixo de 0,5%.

A presença do monômero funcionalizante reduziu os valores de densidade das partículas funcionalizadas com DEGDMA em relação às outras partículas. Os valores área superficial apresentaram pequenas variações em função do funcionalizante considerado, valores estes ligeiramente menores do que o registrado para as partículas não funcionalizadas. Com relação ao tamanho de partícula, aquelas sintetizadas na presença de ácido cítrico apresentaram mediana inferior às demais. O uso do MOEP resultou em tamanho de partícula maior do que as demais condições avaliadas. O potencial zeta das partículas variou dentro de um intervalo relativamente pequeno.

Tabela 5.1 - Caracterização das partículas sintetizadas no estudo: análise elementar, densidade teórica, área superficial, distribuição de tamanho e potencial zeta

Funcionalizante da partícula de DCPD	% (em peso) de funcionalizante	Densidade (g/cm ³)	Área Superficial (m ² /g)	D ₅₀ (µm)	Potencial Zeta (mV)
Ácido acrílico	0,1	2,41	25	21	-0,9
Ácido cítrico	1,4	2,45	22	10	-10,6
DEGDMA	9,3	2,13	22	22	-4,5
MOEP	0,3	2,38	22	38	-14,2
Não Funcionalizado (NF)	N/A	2,53	30	21	-5,2

N/A: não se aplica

5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de MEV estão apresentadas nas figuras 5.2 e 5.3. Para as partículas de DCPD não funcionalizadas, funcionalizadas com ácido acrílico ou DEGDMA, as imagens mostram partículas em forma de placas alongadas. Para as sínteses que utilizaram ácido cítrico ou MOEP, pode-se observar aglomerados de partículas em formato de flor. As placas que compõem as partículas de DCPD funcionalizadas com ácido cítrico se apresentam de formato de agulhas, enquanto que as placas do material funcionalizado com MOEP parecem mais quadradas e mais espessas.

Figura 5.2 - Partículas de DCPD observadas em microscópio eletrônico de varredura. A: DCPD funcionalizado com ácido acrílico; B: DCPD funcionalizado com DEGDMA; C: DCPD funcionalizado com MOEP; D: DCPD não funcionalizado

Figura 5.3 - Partículas de DCPD funcionalizadas com ácido cítrico observadas em microscópio eletrônico de varredura. A: menor aumento; B: maior aumento

5.2 GRAU DE CONVERSÃO

Todos os grupos experimentais apresentaram graus de conversão estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$, Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Médias e desvios-padrão para o grau de conversão de compósitos experimentais contendo diferentes partículas de DCPD. Valores seguidos de uma mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Material	Grau de Conversão
Controle (sem DCPD)	77,7 (0,7) A
Ácido acrílico	80,1 (1,2) A
Ácido cítrico	76,8 (0,6) A
DEGDMA	79,4 (0,1) A
MOEP	82,6 (6,5) A
Não funcionalizado	80,1 (4,4) A

5.3 RESISTÊNCIA À FLEXÃO BIAxIAL E MÓDULO FLEXURAL

Os resultados de resistência à flexão biaxial e módulo flexural estão ilustrados nas figuras 5.4 e 5.5, respectivamente. Para resistência à flexão biaxial, após 24 horas apenas os materiais que continham partículas funcionalizadas com ácido acrílico e DEGDMA foram estatisticamente semelhantes ao material controle sem DCPD. Os grupos cujos compósitos continham partículas funcionalizadas com ácido cítrico ou MOEP apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao material contendo partículas não funcionalizadas. Após 60 dias, todos os materiais apresentaram redução estatisticamente significativa na resistência, entre 27% e 35%. Para o mesmo período, apenas o material contendo partículas funcionalizadas com DEGDMA manteve-se estatisticamente semelhante ao

controle positivo (sem DCPD) e superior ao controle negativo (DCPD não funcionalizado). Todos os outros materiais apresentaram resultados de resistência à fratura estatisticamente semelhantes ao controle negativo.

Para os dados de módulo flexural, a interação “material x tempo” foi estatisticamente significativa. Após 24 horas, os compósitos contendo partículas não funcionalizadas e funcionalizadas com MOEP, DEGDMA e ácido acrílico foram estatisticamente semelhantes entre si e apresentaram valores superiores ao controle positivo e ao compósito contendo partículas sintetizadas na presença de ácido cítrico. Após 60 dias, o controle positivo (compósito sem DCPD) e os materiais contendo partículas funcionalizadas com DEGDMA e ácido cítrico não apresentaram reduções estatisticamente significantes. Além disso, todos os materiais apresentaram valores estatisticamente semelhantes ao controle positivo, exceto o que continha partículas funcionalizadas como ácido acrílico, o qual apresentou a maior redução.

Figura 5.4 - Médias e desvios-padrão dos valores resistência à flexão biaxial (em MPa) em função da partícula de DCPD e do período de armazenamento. Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p>0,05$)

Figura 5.5 - Médias e desvios-padrão dos valores de módulo flexural (em GPa) em função da partícula de DCPD e do período de armazenamento. Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS SUPERFÍCIES DE FRATURA

Exemplos das superfícies de fratura dos espécimes testados no ensaio de flexão biaxial são apresentados nas figuras 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11. É possível observar a presença de placas finas para os materiais contendo DCPD não funcionalizado, funcionalizado com ácido acrílico ou com DEGDMA. Para os materiais contendo DCPD funcionalizado com ácido cítrico ou MOEP é possível observar os arranjos em formato de flor em meio às partículas de vidro de bário. Não houve diferenças marcantes entre as superfícies dos materiais fraturados após 24 horas ou 60 dias. Porém, apenas para os compósitos controle (positivo e negativo) a superfície de fratura dos corpos de prova testados após 60 dias apresenta aspecto mais irregular.

Figura 5.6 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material controle após armazenamento em água. A e C: 24 horas; B e D: 60 dias

Figura 5.7 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD funcionalizado com ácido acrílico após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60 dias

Figura 5.8 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD funcionalizado com ácido cítrico após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60

Figura 5.9 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD funcionalizado com DEGDMA após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60 dias

Figura 5.10 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD funcionalizado com MOEP após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60 dias

Figura 5.11 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura das superfícies de fratura do material contendo DCPD não funcionalizado após armazenamento em água. A, C e E: 24 horas; B, D e F: 60 dias

5.5 LIBERAÇÃO DE ÍONS

As concentrações (em ppm) de íons Ca^{2+} , HPO_4^{2-} e Ba^{2+} liberadas pelos compósitos são apresentadas nas tabelas 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente. Para a liberação de cálcio, a análise de variância de dois fatores mostrou que a interação “material x tempo” foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Para todos os compósitos, observa-se uma tendência de redução nas concentrações liberadas ao longo do período de imersão, com valores estatisticamente mais altos nos primeiros 15 dias. Com exceção do material com partículas funcionalizadas com MOEP não foram verificadas diferenças nas concentrações liberadas nos demais períodos para um mesmo material. Para um mesmo período não houve diferenças entre materiais, com poucas exceções.

As concentrações liberadas de HPO_4^{2-} foram inferiores às concentrações de cálcio. A interação entre os fatores foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Nos primeiros 15 dias foi verificada uma tendência de maior liberação de íons fosfato para os compósitos com partículas funcionalizadas em relação ao compósito contendo partículas não funcionalizadas. Como observado para liberação de íons cálcio, a maior redução na liberação de HPO_4^{2-} foi entre os períodos de 15 e 30 dias de armazenamento. Nos períodos de armazenamento subsequentes a 30 dias, a liberação se manteve constante não apresentando diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos grupos. Para um mesmo período não houve diferenças significantes entre os grupos, com poucas exceções: o compósito contendo partículas funcionalizadas com ácido cítrico e o compósito contendo partículas funcionalizadas com DEGDMA liberaram concentrações semelhantes apenas aos 30 dias. A outra exceção foi verificada aos 45 dias, quando o material com partículas funcionalizadas com MOEP apresentou-se diferente do compósito com partículas funcionalizadas com ácido cítrico.

Para a liberação de íons bário apenas os fatores foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$). Uma vez que todos os materiais apresentavam a mesma porcentagem em volume de partículas de vidro, as concentrações liberadas foram estatisticamente semelhantes para todos os materiais em um

mesmo período de imersão. A única diferença estatisticamente significativa foi observada no período de 15 dias quando o compósito contendo partículas funcionalizadas com ácido cítrico apresentou liberação estatisticamente superior a dos outros grupos e foi semelhante apenas ao material com partículas não funcionalizadas. Com exceção do material que possuía partículas funcionalizadas com ácido cítrico que apresentou redução estatisticamente significativa entre 15 e 30 dias, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes para um mesmo material nos diferentes períodos de imersão.

Tabela 5.3 - Médias e desvios-padrão das concentrações de íons cálcio (ppm) liberadas por compósitos experimentais contendo partículas de DCPD em função do período de imersão (em dias). Valores seguidos de uma mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Material	Ácido	Ácido	DEGDMA	MOEP	NF
Dias	acrílico	cítrico			
15 dias	9,2 (1,0) AB	10,8 (2,0) A	7,3 (2,4) BCD	10,1 (2,8) A	8,1 (0,6) ABC
30 dias	5,5 (1,1) CDEFGH	6,6 (0,6) BCDE	2,9 (0,4) GH	5,6 (0,9) CDEFG	3,6 (0,4) FGH
45 dias	6,1 (1,4) CDEF	4,8 (0,8) DEFGH	3,8 (0,2) FGH	2,9 (0,3) H	5,3 (0,5) CDEFGH
60 dias	4,6 (0,8) EFGH	5,4 (0,6) CDEFGH	2,8 (0,3) H	3,1 (0,5) GH	3,6 (0,3) GH

Tabela 5.4 - Médias e desvios-padrão das concentrações de íons fósforo (ppm) liberadas por compósitos experimentais contendo partículas de DCPD em função do período de imersão (em dias). Valores seguidos de uma mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)

Material	Ácido	Ácido	DEGDMA	MOEP	NF
Dias	acrílico	cítrico			
15 dias	6,0 (0,3) AB	6,9 (2,2) A	4,6 (0,6) BC	7,2 (1,6) A	3,4 (1,6) CDE
30 dias	3,0 (0,3) CDEF	3,4 (0,5) CDE	1,6 (0,1) EF	1,7 (0,3) DEF	2,1 (0,3) DEF
45 dias	3,0 (0,8) CDEF	3,5 (0,6) CD	1,6 (0,4) EF	1,4 (0,0) F	2,0 (0,3) DEF
60 dias	3,1 (0,7) CDEF	3,4 (0,4) CDE	1,4 (0,2) F	1,5 (0,4) EF	1,7 (0,3) DEF

Tabela 5.5 - Médias e desvios-padrão das concentrações de íons bário (ppm) liberadas por compósitos experimentais contendo partículas de DCPD em função do período de imersão (em dias). Valores seguidos de uma mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)

Material	Ácido	Ácido	DEGDMA	MOEP	NF
Dias	acrílico	cítrico			
15 dias	2,6 (0,1) BC	3,4 (0,4) A	2,5 (0,2) BC	2,5 (0,1) BC	2,7 (0,2) AB
30 dias	2,2 (0,1) BC	2,6 (0,3) BC	2,1 (0,1) BC	2,1 (0,1) BC	2,3 (0,2) BC
45 dias	2,1 (0,3) BC	2,4 (0,2) BC	1,9 (0,1) C	1,9 (0,1) BC	2,1 (0,1) BC
60 dias	2,2 (0,2) BC	2,6 (0,5) BC	2,3 (0,7) BC	2,6 (0,7) BC	2,4 (0,5) BC

5.6 EFEITO PROTETOR SOBRE O ESMALTE SUBMETIDO A DESAFIO CARIOGÊNICO

5.6.1 Delta KHN

Os valores de ΔKHN são apresentados na tabela 5.6. Para $\Delta KHN_{\text{superficial}}$, foi observada diferença estatisticamente significativa apenas entre o compósito contendo partículas funcionalizadas com ácido cítrico e o compósito contendo partículas funcionalizadas com DEGDMA ($p < 0,05$). Para $\Delta KHN_{\text{transversal}}$, a interação “material x profundidade” não foi estatisticamente significativa ($p = 0,989$). Porém, ao analisar-se o fator “profundidade”, observa-se que as maiores reduções de ΔKHN foram observadas em 10 μm e 30 μm . Não foram verificadas diferenças para o ΔKHN a partir de 50 μm ($p < 0,001$, Tabela 5.7). Em relação ao fator “material”, o esmalte ao redor do compósito contendo DCPD funcionalizado com ácido acrílico apresentou maior redução em sua KHN do que o contendo DCPD não funcionalizado e do que o material controle ($p < 0,01$, Tabela 5.8).

Tabela 5.6 - Médias e desvios padrão dos dados de $\Delta KHN_{\text{superficial}}$ e $\Delta KHN_{\text{transversal}}$ em função do material e da profundidade analisada. Para $\Delta KHN_{\text{superficial}}$, valores seguidos pela mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre grupos (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Material		Controle	Ácido acrílico	Ácido cítrico	DEGDMA	MOEP	NF
Profundidade							
ΔKHN		-88 (5)	-91 (6)	-84 (11)	-92 (5)	-85 (8)	-85 (7)
superficial		AB	AB	B	A	AB	AB
ΔKHN	10 μm	-41 (15)	-55 (16)	-45 (14)	-45 (17)	-43 (14)	-50 (18)
	30 μm	-18 (16)	-26 (24)	-22 (17)	-21 (26)	-18 (14)	-20 (14)
	50 μm	-6 (17)	-20 (20)	-17 (11)	-10 (19)	-12 (15)	-4 (18)
	70 μm	-8 (14)	-12 (21)	-8 (16)	-8 (10)	-7 (22)	-3 (15)
	90 μm	-10 (9)	-19 (17)	-10 (14)	-5 (15)	-10 (13)	-3 (7)
transversal							

Tabela 5.7 - Médias e desvios-padrão dos valores de $\Delta KHN_{transversal}$ do esmalte bovino para o fator “profundidade”. Valores seguidos da mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa nas linhas (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)

Profundidade	Média ΔKHN
10 μm	- 46 (16) A
30 μm	- 21 (19) B
50 μm	- 11 (17) C
70 μm	- 8 (17) C
90 μm	- 9 (13) C

Tabela 5.8 - Médias e desvios-padrão dos valores de $\Delta KHN_{transversal}$ do esmalte bovino para o fator “material”. Valores seguidos da mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa nas linhas (ANOVA/teste de Tukey, $p>0,05$)

Material	Média ΔKHN
Controle (sem DCPD)	- 16 (19) A
Ácido acrílico	- 26 (24) B
Ácido cítrico	- 20 (19) AB
DEGDMA	-18 (23) AB
MOEP	- 18 (20) AB
Não funcionalizado	- 16 (23) A

6 DISCUSSÃO

Na primeira etapa desse estudo, foi descrita a síntese de partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) funcionalizadas com diferentes monômeros orgânicos. A formação de DCPD foi confirmada pelo teste de difração de raio X. Entre as fases dos ortofosfatos de cálcio o DCPD, ou brushita, foi escolhido por apresentar maior solubilidade do que outras fases (27) e, portanto, um maior potencial para liberação de íons. Adicionalmente, seu índice de refração é compatível com aqueles dos monômeros constituintes da matriz resinosa e dos vidros de metais pesados utilizados como reforço em compósitos dentários (89).

A funcionalização *ab initio* teve como propósito a obtenção de partículas com maior área superficial e tamanho reduzido. Dentre os monômeros avaliados como funcionalizantes, o DEGDMA apresentou a maior retenção na superfície do DCPD. Curiosamente, trata-se do único composto cujo mecanismo de interação com o cálcio não envolve grupos ionizáveis, e sim uniões tipo íon-dipolo. O DEGDMA apresenta um oxigênio central, compartilhado por ambos os grupos etileno glicol. Essa configuração espacial provavelmente facilita a interação desse monômero com o cálcio durante a formação das partículas (22). Por exemplo, quando adicionados na mesma concentração na síntese, a retenção do DEGDMA (34,4% em massa) foi maior do que a do TEGDMA (14,1% em massa) (22).

O ácido cítrico e ácido acrílico foram estudados previamente como modificadores de superfície para hidroxiapatita (13-15, 79). O MOEP foi testado em relação ao seu potencial de nucleação de partículas de CaP (81). Todas estes compostos, em teoria, poderiam promover a formação de partículas menores do que as obtidas na síntese de partículas não funcionalizadas. No entanto, os resultados da caracterização mostraram que, com exceção de diferenças relativamente pequenas em tamanho e potencial zeta, as partículas sintetizadas na presença destes três monômeros ácidos não apresentaram alterações significativas em relação ao controle.

Conforme evidenciado na análise elementar e, indiretamente, pelos valores de densidade, a retenção dos monômeros ácidos na superfície das

partículas foi pequena. Estes achados sugerem que nas condições de pH em que as sínteses foram realizadas (inicial: 6,2 – 6,6; final: 4,1 - 4,5), os grupos carboxílicos dos ácidos cítrico e acrílico e do grupo fosfato do MOEP não se encontravam suficientemente dissociados para garantir um alto grau de interação com os íons cálcio. O ácido cítrico possui três grupos carboxila (-COOH) com constantes de dissociação $pK_{a1}=3,14$, $pK_{a2}=4,77$ e $pK_{a3}=6,39$. De acordo com dados da literatura, em pH 5,4 as dissociações teoricamente esperadas para cada um dos grupos carboxílicos são 75% (HA^-), 17% (HA^{2-}) e 8% (HA^{3-}) (90). De fato, partículas de hidroxiapatita sintetizadas na presença de ácido cítrico em pH alcalino (pH=10) apresentaram porcentagens de funcionalização entre 35% e 60% (23). O ácido acrílico, com $pK_a=4,25$, inicialmente apresentava o seu grupo carboxílico dissociado; porém, a redução do pH ao longo da síntese diminuiu a dissociação até atingir o nível teoricamente esperado de 50%, visto que o pH ao final da síntese é próximo do pK_a . Na prática, não foram observadas evidências de funcionalização, exceto por uma ligeira redução na densidade. Para o MOEP ($pK_{a1}=7,21$ e $pK_{a2}=12,67$), possivelmente a dissociação foi pequena, o que também se refletiu na análise elementar. Desta forma, fica evidente que a funcionalização de partículas de CaP com monômeros ácidos requer o controle das condições de pH do meio reacional para garantir a dissociação dos grupos ionizáveis. No entanto, a precipitação do DCPD ocorre preferencialmente entre pH 4 e 6 (29) e, portanto, não se deve esperar um alto grau de dissociação destes compostos.

A falta de uma funcionalização efetiva das partículas de DCPD não significa que a presença dos monômeros na síntese não promoveram efeito. A morfologia das partículas, por exemplo, foi afetada pela presença do ácido cítrico e do MOEP. Enquanto as partículas não-funcionalizadas e funcionalizadas com ácido acrílico e DEGDMA apresentaram formato de placas já verificado em estudos anteriores (16, 21, 22, 24, 91), a funcionalização com ácido cítrico resultou em partículas aciculares. Isso pode ser explicado pela habilidade dos íons citrato em inibir o crescimento do cristal em uma direção específica, induzindo a formação de cristais em formato de agulha (92). As partículas sintetizadas na presença de MOEP apresentaram placas com tendência de se agruparem na forma de flor, o que resultou em

partículas relativamente maiores do que as obtidas nas demais condições. Outra evidência do efeito dos funcionalizantes foi o menor potencial zeta apresentado pelas partículas sintetizadas na presença do MOEP e do ácido cítrico. Muito embora a presença destas moléculas não tenha sido detectada na análise elementar, a mensuração de potenciais zeta negativos na superfície das partículas indica a presença de cargas negativas provenientes deste compostos (90).

Na segunda parte etapa do estudo, as partículas foram incorporadas a matrizes resinosas e os materiais resultantes foram testados em relação ao grau de conversão, propriedades mecânicas e efeito protetor sobre o esmalte submetido a desafio cariogênico. Para o grau de conversão, a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos concorda com um estudo anterior (6). Esse fato pode ser explicado pela proximidade dos valores de índice de refração do DCPD (1,54–1,55) (18) com o índice de refração do vidro de bário (1,53) (19), dessa forma a transmissão de luz durante a fotopolimerização do compósito não é afetada.

A substituição de 20 vol% de partículas de reforço por partículas de DCPD não funcionalizado resultou em uma redução de 20% na resistência à flexão biaxial inicial. Apenas o compósito contendo 20 vol% de partículas de DCPD funcionalizado com DEGDMA apresentou valor semelhante ao material controle (sem DCPD). O resultado obtido pelo material contendo DCPD funcionalizado com DEGDMA pode ser atribuído ao maior teor de funcionalizante presente na partícula, associado ao fato do DEGDMA poder se co-polimerizar com os monômeros da matriz resinosa. O bom desempenho deste material confirma resultados anteriores obtidos com compósitos contendo partículas de DCPD funcionalizadas com monômeros de dimetacrilatos (21, 24). Por outro lado, os materiais contendo partículas sintetizadas na presença de ácido cítrico ou MOEP apresentaram valores de resistência inicial semelhantes ao controle negativo (20 vol% de DCPD não funcionalizado), enquanto o compósito contendo DCPD funcionalizado com ácido acrílico foi semelhante aos dois sub-grupos estatísticos. No caso das partículas sintetizadas na presença de ácido acrílico e MOEP, os resultados semelhantes ao controle negativo podem ser explicados pela baixa retenção dos monômeros à superfície das partículas. No caso do ácido cítrico, a

ausência de grupos metacrilato em sua estrutura permitiria prever um resultado semelhante ao obtido pelo compósito contendo partículas não funcionalizadas. Adicionalmente, é importante destacar que o menor tamanho das partículas sintetizadas na presença do ácido cítrico em relação às não-funcionalizadas não teve efeito positivo sobre a resistência à fratura, como poderia ser antecipado (12). Possivelmente, para apresentar algum efeito sobre a resistência à fratura, a redução de tamanho deveria ser de maior magnitude.

Todos os compósitos testados apresentaram redução estatisticamente significativa na resistência após 60 dias de imersão em água, entre 23 e 35 %. A difusão de fluidos no interior do material está relacionada à hidrofilia dos monômeros presentes na matriz e a fase inorgânica (93, 94). Em relação a matriz orgânica, a taxa de absorção de água depende da densidade da rede polimérica, do potencial para formação de pontes de hidrogênio e interações polares (95). Os monômeros TEGDMA e BisGMA apresentam em suas estruturas grupos éter e grupos hidroxila, respectivamente. Devido a presença desses grupos, esses monômeros são levemente hidrofílicos o que facilita a absorção e difusão de água no interior do material. Os fatores relacionados à fase inorgânica como tamanho das partículas, área superficial e a característica dos agentes de ligação também influenciam a solubilidade do material (96). De maneira geral, a presença de água, além de degradar a matriz orgânica, também ocasiona ruptura da união entre as partículas carga e a matriz resinosa, levando à redução da resistência (66).

Os materiais contendo DCPD apresentaram maiores reduções percentuais na resistência, conforme já foi observado em um estudo anterior (6). A ausência de união química entre carga e matriz ou a funcionalização incompleta facilita o trânsito de fluidos na interface partícula-matriz, ocasionando maior degradação (24). No teste de flexão biaxial, a fratura do corpo de prova se inicia a partir de um defeito localizado no centro do disco, no lado exposto a tensões de tração (97). Assim, é possível que a degradação da interface partícula-matriz na superfície do corpo de prova propicie o aparecimento de defeitos iniciadores de trincas.

O compósito contendo partículas funcionalizadas com DEGDMA manteve-se estatisticamente semelhante ao material controle. De maneira

geral, os melhores resultados de resistência à fratura alcançados por esse material podem ser associados à maior interação química entre as partículas de DCPD e a matriz orgânica, o que permite uma distribuição de tensões mais eficiente na interface DCPD/matriz e dificulta a propagação de trincas (22). Além disso, a maior interação entre ambas as fases evita que as partículas de DCPD funcionem como defeitos iniciadores de trincas.

A presença de 20 vol% de partículas relativamente grandes no interior do material apresentou um efeito benéfico sobre o módulo flexural após 24 horas, visto que os compósitos controle e aquele contendo DCPD funcionalizado com ácido cítrico obtiveram valores estatisticamente inferiores aos dos demais grupos. Este achado pode ser explicado pelo fato das placas de DCPD aumentarem a interação física entre os componentes inorgânicos (5, 98), reduzindo a deformação elástica do material sob carga (99). Adicionalmente, a ausência de diferenças entre o compósito contendo DCPD funcionalizado com DEGDMA e aqueles com DCPD funcionalizado com MOEP e ácido acrílico sugerem que a união química entre a matriz resinosa e fase inorgânica não é um fator determinante para a rigidez do material (100). Após 60 dias, os materiais contendo partículas funcionalizadas com DEGDMA e ácido cítrico, além do controle, não apresentaram reduções estatisticamente significantes no módulo flexural. As reduções estatisticamente significantes observadas para os outros materiais podem ser explicadas pelo maior trânsito de água na interface partícula-matriz, o que aumentaria o amolecimento da matriz resinosa (22).

A liberação acumulada de íons Ca^{2+} variou de 17 ppm (0,42 mmol/L) a 28 ppm (0,69 mmol/L), enquanto os valores para íons HPO_4^{2-} ficaram entre 9 ppm (0,30 mmol/L) e 17 ppm (0,56 mmol/L). Os valores para liberação de íons cálcio são próximos a resultados de outros estudos que avaliaram a liberação de íons por 56 dias de compósitos contendo 37,5% ou 65% em massa de DCPA (para 37,5%: 19,6 ppm ou 0,49 mmol/L e para 65%: 24 ppm ou 0,6 mmol/L) (8, 12). As maiores concentrações iônicas foram liberadas nos primeiros 15 dias, possivelmente devido à dissolução das partículas na superfície da amostra (24). Entre 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças nas concentrações liberadas. Os estudos que utilizaram DCPA citados previamente também apresentam a obtenção de um platô na

liberação após 28 dias de imersão até 56 dias. As menores concentrações de Ca^{2+} liberadas pelo material contendo partículas funcionalizadas com DEGDMA também foram observadas em um estudo anterior (22). Um fator que pode estar vinculado a esses resultados deriva do um menor conteúdo efetivo de DCPD nas partículas, uma vez que parte do volume de DCPD está ocupado pelo monômero funcionalizante. Ademais, a funcionalização da partícula parece retardar o acesso da água à partícula, resultando em menores concentrações iônicas liberadas (22).

Os valores obtidos para liberação de HPO_4^{2-} são inferiores em relação à liberação de íons cálcio, o que também foi observado em estudos prévios (5, 6, 10, 21, 22, 24). Isso pode ser explicado pela estrutura cristalina dos ortofosfatos de cálcio. Enquanto os cátions de cálcio ocupam os interstícios, os tetraedros de fosfato são mais difíceis de serem removidos do arcabouço cristalino de devido à formação de pontes de hidrogênio entre os átomos de oxigênio e a água estrutural, inibindo sua liberação (101).

Ainda em relação à liberação de íons, observou-se uma tendência numérica de maior liberação nos materiais contendo partículas de DCPD funcionalizadas com monômeros ácidos. Mesmo considerando-se o baixo teor de funcionalizante nas partículas, uma possível hipótese seria que a superfície das partículas teria se tornado mais hidrofílica, aumentando o trânsito de fluidos dentro desse material em relação aos materiais contendo DCPD funcionalizado com DEGDMA e DCPD não-funcionalizado (102).

A liberação de íons bário foi, no geral, semelhante entre todos os grupos avaliados e se manteve constante durante os períodos de imersão. Apenas o material que possuía partículas funcionalizadas com ácido cítrico obteve resultados superiores estatisticamente aos demais ao final dos primeiros 15 dias. As concentrações acumuladas de bário mensuradas (ao redor de 9,5 ppm) são superiores as encontrados na literatura. Um estudo testou compósitos experimentais formulados com BisGMA/TEGDMA e 53 vol% de partículas de carga e, após dois meses de armazenamento saliva artificial (pH = 6,7) e água destilada, os valores de bário variaram entre 3,3 e 3,9 ppm respectivamente (103). Uma possível explicação é o aumento de interfaces dentro do material e o maior trânsito de fluidos decorrente da presença de DCPD, o que permitiu uma maior saída de íons.

A remineralização pode ser descrita como um processo que envolve a transferência de íons cálcio e fosfato de uma fonte externa ao dente, promovendo a precipitação de cristais de hidroxiapatita (45, 104). Poucos trabalhos correlacionam a liberação de íons de compósitos bioativos com remineralização. Em um deles foi observado que a liberação de íons Ca^{2+} entre 12 e 20 ppm (portanto, similar ao observado no presente estudo) correspondeu a uma recuperação do conteúdo mineral da dentina de 47% (2). Outro estudo avaliando um compósito contendo 40% em peso de ACP relatou liberações de cerca de 29,7 ppm de Ca^{2+} e 16,7 ppm de HPO_4^{2-} , as quais levaram a uma remineralização em esmalte da ordem de 14% (40).

Os valores de KHN superficial (APÊNDICE A) obtidos na região controle foram semelhantes aos reportados em outros estudos (87, 105, 106). A aleatorização estratificada foi bem-sucedida, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre grupos no lado controle. O coeficiente de variação dos dados foi relativamente baixo (20% em média) e as reduções observadas na microdureza superficial e transversal após a ciclagem de pH são compatíveis com aquelas relatadas na literatura (105). Finalmente, a profundidade da lesão estimada a partir da comparação entre os resultados de microdureza transversal do esmalte controle e exposto situou-se entre 50 e 70 μm , semelhante aos valores descritos em outros estudos (105, 107).

Mesmo considerando-se algumas diferenças estatisticamente significantes encontradas para $\Delta\text{KHN}_{\text{superficial}}$ e $\Delta\text{KHN}_{\text{transversal}}$, os resultados não evidenciaram o efeito protetor dos materiais contendo 20 vol% de DCPD sobre o esmalte adjacente, visto não ter havido diferenças entre estes e o material controle. É provável que a ausência de efeito seja decorrente de um conteúdo insuficiente de DCPD na formulação dos compósitos. De fato, alguns estudos que avaliaram remineralização de lesões artificiais utilizaram formulações com maior conteúdo de CaP, por exemplo, 40% em peso de ACP (1, 4). Um estudo *in situ* que avaliou o efeito protetor sobre o esmalte contra desmineralização utilizou compósitos contendo 40% em peso de ACP e 20% de vidros de bário para restaurar cavidades preparadas em esmalte bovino. Através de microradiografia transversal (TMR), foi comprovado que após 14 dias na presença de biofilme, os dentes restauradas com resina

bioativa apresentaram perda mineral (ΔZ) de 14 vol%. μm , enquanto que os dentes restaurados com material controle (sem ACP) apresentaram perda mineral de 34 vol%. μm (41).

Todavia, um estudo recente, verificou que, compósitos contendo 10 ou 20 vol% de DCPD não funcionalizado ou funcionalizado com diferentes teores de TEGDMA, foram capazes de promover recuperação mineral e reduzir a profundidade das lesões de esmalte (91). Outro estudo observou menores reduções para microdureza transversal (-1.2% a -3.5%) ao redor de compósitos contendo 10% e 20 vol% de DCPD quando comparadas com as restaurações feitas com o material controle sem DCPD (-12.5%) (106), evidenciando um efeito protetor contra a desmineralização. Entretanto, esses estudos realizaram a ciclagem de pH por 16 e 14 dias respectivamente. Dessa forma, a ausência de efeito protetor contra a desmineralização no presente estudo pode estar relacionada com a duração da ciclagem de pH. Outros estudos *in vitro* e *in situ* realizam a ciclagem de pH por maior tempo, sendo no mínimo 14 (1, 41, 107) chegando a até 30 dias (4, 64). Dessa forma, estudos comparando diferentes durações da ciclagem são necessários para confirmação dessa hipótese.

Os resultados aqui apresentados sugerem que estudos futuros envolvendo a síntese de partículas de DCPD na presença de monômeros ácidos devem levar em consideração o pH do meio reacional a fim de garantir que os grupos ionizáveis estejam suficientemente dissociados para se ligarem aos íons cálcio durante a cristalização. Adicionalmente, o efeito protetor de compósitos contendo DCPD sobre o esmalte adjacente à restauração deverá ser avaliado utilizando-se frações mais elevadas destas partículas.

7 CONCLUSÃO

Como base nos resultados é possível concluir que:

- Partículas de fosfato dicálcico dihidratado não funcionalizadas e funcionalizadas *ab initio* com ácido cítrico, ácido acrílico, MOEP e DEGDMA foram sintetizadas e caracterizadas. Nas condições de pH das sínteses a funcionalização não promoveu a obtenção com maior área superficial em relação às partículas não-funcionalizadas. A funcionalização com ácido cítrico foi efetiva para redução do tamanho das partículas. Apenas as partículas DCPD funcionalizadas com DEGDMA apresentaram efetiva retenção do monômero funcionalizante na sua superfície.

- O grau de conversão dos materiais contendo DCPD (funcionalizado ou não) foi semelhante ao material controle sem DCPD. A adição de DCPD promoveu reduções na resistência à flexão biaxial dos compósitos em ambos os períodos, com exceção do material contendo partículas funcionalizadas com DEGDMA, que se manteve semelhante ao material controle (sem DCPD). Em 24 horas, a presença de DCPD (funcionalizado ou não) resultou em maiores valores para módulo flexural em relação ao material controle. Após imersão, todos os materiais contendo DCPD apresentaram reduções nos valores de módulo flexural e foram semelhantes ao controle, exceto o material que continha partículas funcionalizadas com ácido acrílico, que apresentou a maior porcentagem de redução. Portanto, a hipótese nula pode ser rejeitada.

- Os maiores e menores valores de liberação de íons foram apresentados, respectivamente, pelos compósitos contendo partículas de DCPD funcionalizadas com ácido cítrico e DEGDMA. De maneira geral, os compósitos contendo DCPD não tiveram um efeito protetor contra a desmineralização provocada pela ciclagem de pH. Portanto, a hipótese nula pode ser rejeitada.

REFERÊNCIAS¹

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

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

3. Dickens SH, Flaim GM. Effect of a bonding agent on in vitro biochemical activities of remineralizing resin-based calcium phosphate cements. *Dent Mater.* 2008;24(9):1273-80.

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

5. Xu HH, Moreau JL. Dental glass-reinforced composite for caries inhibition: calcium phosphate ion release and mechanical properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;92(2):332-40.

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

7. Xu HH, Weir MD, Sun L. Calcium and phosphate ion releasing composite: effect of pH on release and mechanical properties. *Dent Mater.* 2009;25(4):535-42.

8. Xu HH, Weir MD, Sun L, Ngai S, Takagi S, Chow LC. Effect of filler level and particle size on dental caries-inhibiting Ca-PO₄ composite. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(8):1771-9.

9. Moreau JL, Weir MD, Giuseppetti AA, Chow LC, Antonucci JM, Xu HH. Long-term mechanical durability of dental nanocomposites containing amorphous calcium phosphate nanoparticles. *Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012;100(5):1264-73.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

10. Xu HH, Moreau JL, Sun L, Chow LC. Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition. *Dent Mater.* 2011;27(8):762-9.
11. Labella R, Braden M, Deb S. Novel hydroxyapatite-based dental composites. *Biomaterials.* 1994;15(15):1197-200.
12. Xu HH, Weir MD, Sun L. Nanocomposites with Ca and PO₄ release: effects of reinforcement, dicalcium phosphate particle size and silanization. *Dent Mater.* 2007;23(12):1482-91.
13. Arcis RW, Lopez-Macipe A, Toledano M, Osorio E, Rodriguez-Clemente R, Murtra J, et al. Mechanical properties of visible light-cured resins reinforced with hydroxyapatite for dental restoration. *Dent Mater.* 2002;18(1):49-57.
14. Domingo C, Arcis RW, Lopez-Macipe A, Osorio R, Rodriguez-Clemente R, Murtra J, et al. Dental composites reinforced with hydroxyapatite: mechanical behavior and absorption/elution characteristics. *J Biomed Mater Res.* 2001;56(2):297-305.
15. Domingo C, Arcis RW, Osorio E, Osorio R, Fanovich MA, Rodriguez-Clemente R, et al. Hydrolytic stability of experimental hydroxyapatite-filled dental composite materials. *Dent Mater.* 2003;19(6):478-86.
16. Rodrigues MC, Hewer TL, Brito GE, Arana-Chavez VE, Braga RR. Calcium phosphate nanoparticles functionalized with a dimethacrylate monomer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;45:122-6.
17. Qiu SR, Orme CA. Dynamics of Biomineral Formation at the Near-Molecular Level. *Chemical Reviews.* 2008;108(11):4784-822.
18. Anthony JW, Bideaux RA, Bladh KW, Nichols MC. *Handbook of Mineralogy.* Chantilly, VA, USA: Mineralogical Society of America; 2000.
19. Shortall AC, Palin WM, Burtscher P. Refractive index mismatch and monomer reactivity influence composite curing depth. *J Dent Res.* 2008;87(1):84-8.
20. Menger FM, Chlebowski ME. Is the Ether Group Hydrophilic or Hydrophobic? *Langmuir.* 2005;21(7):2689-95.

21. Alania Y, Chiari MD, Rodrigues MC, Arana-Chavez VE, Bressiani AH, Vichi FM, et al. Bioactive composites containing TEGDMA-functionalized calcium phosphate particles: Degree of conversion, fracture strength and ion release evaluation. *Dent Mater*. 2016;32(12):e374-e81.
22. Natale LC, Rodrigues MC, Alania Y, Chiari MDS, Boaro LCC, Cotrim M, et al. Mechanical characterization and ion release of bioactive dental composites containing calcium phosphate particles. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;84:161-7.
23. Lee W-H, Loo C-Y, Zavgorodniy AV, Ghadiri M, Rohanizadeh R. A novel approach to enhance protein adsorption and cell proliferation on hydroxyapatite: citric acid treatment. *RSC Advances*. 2013;3(12):4040-51.
24. Rodrigues MC, Chiari MDS, Alania Y, Natale LC, Arana-Chavez VE, Meier MM, et al. Ion-releasing dental restorative composites containing functionalized brushite nanoparticles for improved mechanical strength. *Dent Mater*. 2018;34(5):746-55.
25. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002;41(17):3130-46.
26. Epple M, Ganesan K, Heumann R, Klesing J, Kovtun A, Neumann S, et al. Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *J Mater Chemistry*. 2010;20(1):18-23.
27. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates in dentistry. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(6):1335-63.
28. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates (CaPO₄): occurrence and properties. *Prog Biomater*. 2016;5:9-70.
29. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci*. 1991;15:1-201.
30. Elliot JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 1994.
31. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chem Rev*. 2008;108(11):4628-69.

32. Owadally ID, Pitt Ford TR. Effect of addition of hydroxyapatite on the physical properties of IRM. *Int Endod J*. 1994;27(5):227-32.
33. Owadally ID, Chong BS, Pitt Ford TR, Wilson RF. Biological properties of IRM with the addition of hydroxyapatite as a retrograde root filling material. *Endod Dent Traumatol*. 1994;10(5):228-32.
34. Arita K, Yamamoto A, Shinonaga Y, Harada K, Abe Y, Nakagawa K, et al. Hydroxyapatite particle characteristics influence the enhancement of the mechanical and chemical properties of conventional restorative glass ionomer cement. *Dent Mater J*. 2011;30(5):672-83.
35. Goenka S, Balu R, Sampath Kumar TS. Effects of nanocrystalline calcium deficient hydroxyapatite incorporation in glass ionomer cements. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012;7:69-76.
36. Zhang Y, Wang Y. The effect of hydroxyapatite presence on the degree of conversion and polymerization rate in a model self-etching adhesive. *Dent Mater*. 2012;28(3):237-44.
37. Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent*. 2011;39(6):430-7.
38. Kamath P, Nayak R, Kamath SU, Pai D. A comparative evaluation of the remineralization potential of three commercially available remineralizing agents on white spot lesions in primary teeth: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2017;35(3):229-37.
39. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Improved properties of amorphous calcium phosphate fillers in remineralizing resin composites. *Dent Mater*. 1996;12(5):295-301.
40. Langhorst SE, O'Donnell JN, Skrtic D. In vitro remineralization of enamel by polymeric amorphous calcium phosphate composite: quantitative microradiographic study. *Dent Mater*. 2009;25(7):884-91.
41. Melo MA, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel calcium phosphate nanocomposite with caries-inhibition in a human in situ model. *Dent Mater*.. 2013;29(2):231-40.

42. Zhang N, Melo MA, Chen C, Liu J, Weir MD, Bai Y, et al. Development of a multifunctional adhesive system for prevention of root caries and secondary caries. *Dent Mater*. 2015;31(9):1119-31.
43. Al-Dulaijan YA, Cheng L, Weir MD, Melo MAS, Liu H, Oates TW, et al. Novel rechargeable calcium phosphate nanocomposite with antibacterial activity to suppress biofilm acids and dental caries. *J Dent*. 2018;72:44-52.
44. Antonucci JM, Skrtic D, Eanes ED. Bioactive polymeric dental materials based on amorphous calcium phosphate. *Polymer Preprints*. 1994;35(2):460-1.
45. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res*. 2010;89(11):1187-97.
46. O'Donnell JN, Antonucci JM, Skrtic D. Amorphous calcium phosphate composites with improved mechanical properties. *J Bioact Compat Polym*. 2006;21(3):169-84.
47. Antonucci JM, Liu DW, Skrtic D. Amorphous Calcium Phosphate Based Composites: Effect of Surfactants and Poly(ethylene oxide) on Filler and Composite Properties. *J Dispers Sci Technol*. 2007;28(5):819-24.
48. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res*. 1997;76(9):1587-95.
49. Zhou C, Zhang D, Bai Y, Li S. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate remineralization of primary teeth early enamel lesions. *J Dent*. 2014;42(1):21-9.
50. Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, et al. Strong nanocomposites with Ca, PO(4), and F release for caries inhibition. *J Dent Res*. 2010;89(1):19-28.
51. Mehdawi I, Neel EA, Valappil SP, Palmer G, Salih V, Pratten J, et al. Development of remineralizing, antibacterial dental materials. *Acta Biomater*. 2009;5(7):2525-39.

52. Saito T, Yamauchi M, Crenshaw MA. Apatite induction by insoluble dentin collagen. *J Bone Miner Res.* 1998;13(2):265-70.
53. Kawasaki K, Ruben J, Stokroos I, Takagi O, Arends J. The remineralization of EDTA-treated human dentine. *Caries Res.* 1999;33(4):275-80.
54. ten Cate JM. Remineralization of caries lesions extending into dentin. *J Dent Res.* 2001;80(5):1407-11.
55. Doi Y, Eanes ED. Transmission electron microscopic study of calcium phosphate formation in supersaturated solutions seeded with apatite. *Calcif Tissue Int.* 1984;36(1):39-47.
56. Gajjeraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1193-204.
57. Koutsoukos PG, Nancollas GH. Crystal growth of calcium phosphates - epitaxial considerations. *J Crystal Growth.* 1981;53(1):10-9.
58. Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials.* 2008;29(8):1127-37.
59. Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *J Dent Res.* 2009;88(8):719-24.
60. Kim J, Arola DD, Gu L, Kim YK, Mai S, Liu Y, et al. Functional biomimetic analogs help remineralize apatite-depleted demineralized resin-infiltrated dentin via a bottom-up approach. *Acta Biomater.* 2010;6(7):2740-50.
61. Weir MD, Ruan J, Zhang N, Chow LC, Zhang K, Chang X, et al. Effect of calcium phosphate nanocomposite on in vitro remineralization of human dentin lesions. *Dent Mater.* 2017;33(9):1033-44.
62. Liang K, Zhou H, Weir MD, Bao C, Reynolds MA, Zhou X, et al. Poly(amido amine) and calcium phosphate nanocomposite remineralization of dentin in acidic solution without calcium phosphate ions. *Dent Mater.* 2017;33(7):818-29.

63. Silva KG, Pedrini D, Delbem AC, Ferreira L, Cannon M. In situ evaluation of the remineralizing capacity of pit and fissure sealants containing amorphous calcium phosphate and/or fluoride. *Acta Odontol Scand.* 2010;68(1):11-8.
64. Uysal T, Amasyali M, Ozcan S, Koyuturk AE, Akyol M, Sagdic D. In vivo effects of amorphous calcium phosphate-containing orthodontic composite on enamel demineralization around orthodontic brackets. *Aust Dent J.* 2010;55(3):285-91.
65. Peters MC, Bresciani E, Barata TJ, Fagundes TC, Navarro RL, Navarro MF, et al. In vivo dentin remineralization by calcium-phosphate cement. *J Dent Res.* 2010;89(3):286-91.
66. Toledano M, Osorio R, Osorio E, Fuentes V, Prati C, Garcia-Godoy F. Sorption and solubility of resin-based restorative dental materials. *J Dent.* 2003;31(1):43-50.
67. Skrtic D, Antonucci JM. Effect of Chemical Structure and Composition of the Resin Phase on Vinyl Conversion of Amorphous Calcium Phosphate-filled Composites. *Polym Int.* 2007;56(4):497-505.
68. Carey CM, Spencer M, Gove RJ, Eichmiller FC. Fluoride release from a resin-modified glass-ionomer cement in a continuous-flow system. Effect of pH. *J Dent Res.* 2003;82(10):829-32.
69. Zhang L, Weir MD, Chow LC, Antonucci JM, Chen J, Xu HH. Novel rechargeable calcium phosphate dental nanocomposite. *Dent Mater.* 2016;32(2):285-93.
70. Moreau JL, Sun L, Chow LC, Xu HH. Mechanical and acid neutralizing properties and bacteria inhibition of amorphous calcium phosphate dental nanocomposite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;98(1):80-8.
71. Antonucci JM, O'Donnell JN, Schumacher GE, Skrtic D. Amorphous Calcium Phosphate Composites and Their Effect on Composite-Adhesive-Dentin Bonding. *J Adhes Sci Technol.* 2009;23(7):1133-47.
72. Uysal T, Amasyali M, Koyuturk AE, Ozcan S, Sagdic D. Amorphous calcium phosphate-containing orthodontic composites. Do they prevent demineralisation around orthodontic brackets? *Aust Orthod J.* 2010;26(1):10-5.

73. Antonucci JM, Skrtic D. Fine-Tuning of Polymeric Resins and Their Interfaces with Amorphous Calcium Phosphate. A Strategy for Designing Effective Remineralizing Dental Composites. *Polymers (Basel)*. 2010;2(4):378-92.
74. Xu HH, Sun L, Weir MD, Takagi S, Chow LC, Hockey B. Effects of incorporating nanosized calcium phosphate particles on properties of whisker-reinforced dental composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;81(1):116-25.
75. Xu HH, Sun L, Weir MD, Antonucci JM, Takagi S, Chow LC, et al. Nano DCPA-whisker composites with high strength and Ca and PO(4) release. *J Dent Res*. 2006;85(8):722-7.
76. Chen WC, Wu HY, Chen HS. Evaluation of reinforced strength and remineralized potential of resins with nanocrystallites and silica modified filler surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(3):1143-51.
77. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED, Eidelman N. Dental composites based on hybrid and surface-modified amorphous calcium phosphates. *Biomaterials*. 2004;25(7-8):1141-50.
78. Natale LC, Rodrigues MC, Alania Y, Chiari MDS, Vilela HS, Vieira DN, et al. Development of calcium phosphate/ethylene glycol dimethacrylate particles for dental applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018.
79. Domingo C, Arcis RW, Osorio E, Toledano M, Saurina J. Principal component analysis and cluster analysis for the characterization of dental composites. *Analyst*. 2000;125(11):2044-8.
80. Werner A, Grunder W. Calcium-induced structural changes of cartilage proteoglycans studied by H NMR relaxometry and diffusion measurements. *Magn Reson Med*. 1999;41(1):43-50.
81. Stancu IC, Filmon R, Cincu C, Marculescu B, Zaharia C, Tourmen Y, et al. Synthesis of methacryloyloxyethyl phosphate copolymers and in vitro calcification capacity. *Biomaterials*. 2004;25(2):205-13.
82. Bustillos OV. Utilização da técnica de espectrometria de massa na análise de gases oclusos em pastilhas de dióxido de urânio. [dissertação]. IPEN/CNEN; 1980.

83. Moura SC, Redigolo MM, Amaral PO, Leao C, Oliveira GACd, Bustillos OV, editors. Analysis of hydrogen, carbon, sulfur and volatile compounds in (U₃Si₂ - Al) nuclear fuel. INAC 2015: international nuclear atlantic conference Brazilian nuclear program State policy for a sustainable world; 2015; Brazil.
84. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*. 1938;60(2):309-19.
85. ISO 6872:1999. In Dentistry - dental ceramics. International Organization for Standardization 1999.
86. Magalhaes AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res*. 2009;43(6):474-83.
87. Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J*. 2008;19(1):21-7.
88. Joint Committee on Powder Diffraction Standards. In: Data ICfD, editor. PDF#09-0077, DCPD.
89. Braga RR. Calcium phosphates as ion-releasing fillers in restorative resin-based materials. *Dent Mater*. 2018.
90. Hanaor D, Michelazzi M, Leonelli C, Sorrell CC. The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. *Journal of the European Ceramic Society*. 2012;32(1):235-44.
91. Alania Y, Natale LC, Nesadal D, Vilela H, Magalhaes AC, Braga RR. In vitro remineralization of artificial enamel caries with resin composites containing calcium phosphate particles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018.
92. Brecevic L, Furedi-Milhofer H. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions. V. The influence of citrate ions. *Calcif Tissue Int*. 1979;28(2):131-6.

93. Dietschi D, Campanile G, Holz J, Meyer JM. Comparison of the color stability of ten new-generation composites: an in vitro study. *Dent Mater.* 1994;10(6):353-62.
94. 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.
95. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006;22(3):211-22.
96. Fan PL, Edahl A, Leung RL, Stanford JW. Alternative interpretations of water sorption values of composite resins. *J Dent Res.* 1985;64(1):78-80.
97. Ornaghi BP, Meier MM, Rosa V, Cesar PF, Lohbauer U, Braga RR. Subcritical crack growth and in vitro lifetime prediction of resin composites with different filler distributions. *Dent Mater.* 2012;28(9):985-95.
98. Rodrigues MC, Xavier TA, Arana-Chavez VE, Braga RR. Polymer-based material containing calcium phosphate particles functionalized with a dimethacrylate monomer for use in restorative dentistry. *J Biomater Appl.* 2016.
99. Braga RR, Yamamoto T, Tyler K, Boaro LC, Ferracane JL, Swain MV. A comparative study between crack analysis and a mechanical test for assessing the polymerization stress of restorative composites. *Dent Mater.* 2012;28(6):632-41.
100. Beatty MW, Swartz ML, Moore BK, Phillips RW, Roberts TA. Effect of microfiller fraction and silane treatment on resin composite properties. *J Biomed Mater Res.* 1998;40(1):12-23.
101. Arsic J, Kaminski D, Poodt P, Vlieg E. Liquid ordering at the Brushite- $\{010\}$ -water interface. *Physical Review B.* 2004;69(24):245406.
102. Raucci MG, Alvarez-Perez MA, Demitri C, Giugliano D, De Benedictis V, Sannino A, et al. Effect of citric acid crosslinking cellulose-based hydrogels on osteogenic differentiation. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(6):2045-56.

103. Soderholm KJ, Mukherjee R, Longmate J. Filler leachability of composites stored in distilled water or artificial saliva. *J Dent Res.* 1996;75(9):1692-9.
104. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:4743-63.
105. Magalhaes AC, Comar LP, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF₄) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. *J Dent.* 2008;36(2):158-62.
106. Kim MJ, Lee SH, Lee NY, Lee IH. Evaluation of the effect of PVA tape supplemented with 2.26% fluoride on enamel demineralization using microhardness assessment and scanning electron microscopy: in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2013;58(2):160-6.
107. Pinto MFC, Alania Y, Natale LC, Magalhaes AC, Braga RR. Effect of Bioactive Composites on Microhardness of Enamel Exposed to Carious Challenge. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2018;26(3):122-8.

APÊNDICE A – Dados descritivos de microdureza superficial e transversal (KHN)

As tabelas apêndice 1 e 2 apresentam os dados descritivos de microdureza superficial e transversal (KHN) para o esmalte controle e exposto, respectivamente. A análise de variância não detectou diferenças estatisticamente significantes na área controle tanto para KHN superficial ($p=0,190$) quanto para e KHN transversal ($p=0,697$). Para o esmalte exposto, também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para KHN superficial ($p=0,167$). Para a KHN transversal, apenas o fator “profundidade” foi estatisticamente significante ($p<0,001$). Houve diferença estatisticamente significante entre os valores de KHN registrados na profundidade de 10 μm e 50 μm (controle, puro/não funcionalizado, ácido acrílico e MOEP) ou entre 10 μm e 70 μm (ácido cítrico e DEGDMA). O fator “material” ($p=0,081$) e a interação “material x profundidade” ($p=1,000$) não foram estatisticamente significantes.

Tabela apêndice 1 - Médias e desvios-padrão dos dados de KHN do esmalte bovino em função da profundidade e do material para o lado controle (ANOVA, $p>0,05$)

Material	Controle	Ácido	Ácido	DEGDMA	MOEP	Puro/NF
Profundidade		acrílico	cítrico			
superfície	265 (24)	288 (45)	236 (86)	286 (34)	263 (43)	256 (61)
10 μm	255 (44)	243 (43)	249 (55)	227 (67)	255 (45)	239 (46)
30 μm	258 (43)	258 (53)	251 (54)	242 (63)	262 (39)	241 (41)
50 μm	262 (40)	259 (47)	259 (59)	239 (65)	264 (54)	242 (51)
70 μm	266 (40)	265 (50)	252 (61)	242 (56)	253 (46)	247 (47)
90 μm	266 (45)	265 (50)	258 (56)	236 (53)	264 (43)	244 (39)

Tabela apêndice 2 - Médias e desvios-padrão dos dados de KHN do esmalte bovino em função da profundidade e do material para o lado exposto. Valores seguidos da mesma letra maiúscula indicam ausência de diferença estatisticamente na mesma coluna. Valores seguidos da mesma letra minúscula indicam ausência de diferença estatisticamente significativa na mesma linha (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

Material Profundidade	Controle	Ácido acrílico	Ácido citrílico	DEGDMA	MOEP	Puro/NF
superfície	32 (12)	26 (12)	31 (22)	22 (12)	39 (21)	36,7 (17,6)
10 µm	151 (53) Ba	112 (50) Ba	142 (60) Ba	127 (57) Ba	146 (42) Ba	119 (45) Ba
30 µm	209 (48) ABa	190 (72) ABa	200 (73) ABa	183 (53) ABa	216 (49) ABa	194 (51) ABa
50 µm	244 (42) Aa	210 (68) Aa	218 (66) ABa	211 (54) ABa	235 (62) Aa	227 (38) Aa
70 µm	242 (43) Aa	235 (74) Aa	231 (64) Aa	221 (49) Aa	240 (70) Aa	235 (33) Aa
90 µm	240 (38) Aa	227 (76) Aa	232 (54) Aa	224 (52) Aa	240 (56) Aa	234 (28) Aa

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

São Paulo, 07 de março de 2018.

CEUA/FOUSP/Of.01

Senhor Pesquisador,

Em resposta à solicitação para inclusão da aluna Marina Damasceno e Souza Chiari ao Protocolo de número 007/2016 aprovado anteriormente pela CEUA, informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da USP em reunião ordinária realizada em 05 de março de 2018, aprovou sua solicitação.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP

Ilmo. Senhor
Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga
ODB