



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Ação de nanopartículas de hidroxiapatita contendo  
estrôncio e carregadas por colágeno na remineralização e  
obliteração dos túbulos dentinários**

Jeferson Mateus Moussa Macedo

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

VERSÃO CORRIGIDA

**Ação de nanopartículas de hidroxiapatita contendo  
estrôncio e carregadas por colágeno na remineralização e  
obliteração dos túbulos dentinários**

Jeferson Mateus Moussa Macedo

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ramos

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

Macedo, Jeferson Mateus Moussa

Ação de nanopartículas de hidroxiapatita contendo estrôncio e carregadas por colágeno na remineralização e obliteração dos túbulos dentinários. Ribeirão Preto, 2022.

99 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Ramos, Ana Paula.

1. Hidroxiapatita 2. Estrôncio 3. Dentina 4. Colágeno.

“Se o grão de trigo que cai na terra não morre,  
ele continua só um grão de trigo;  
mas se morre, então produz muito fruto”

João 12, 24-26

Aos meus pais Amine e Arnaldo pelo apoio incondicional.

À minha irmã Isabella, meu maior exemplo de coragem.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Amine e Arnaldo, por todo apoio, cuidado, confiança nas minhas escolhas, e por serem meu alicerce e exemplo de vida. Agradeço minha irmã Isabella por ser uma pessoa tão inspiradora em minha vida, me ajudando em minhas conquistas e, nos momentos mais difíceis, sendo fonte de resiliência.

À minha orientadora Ana Paula Ramos pela oportunidade que me concedeu, por todo ensinamento que me proporcionou e por toda confiança e estímulo para superar sempre. Obrigado por tanto aprendizado que levarei por toda vida.

A todos os membros do laboratório de Físico-Química de Colóides e Superfícies, aos atuais e aos que já se foram, pelas experiências trocadas durante nossa convivência, em especial ao Pedro, Israel, Diane, Maryanne, Bianca, Débora, Larissa, Camila, Marcos e Lucas. Aos colegas de outros laboratórios e departamentos que também pude conviver: Tatiane, Cláudio, Luiz, Letícia, Pâmela e Viviane.

À professora Gisele Faria (Departamento de odontologia Restauradora – UNESP) pela colaboração com experimentos de cultura de células da polpa dental humana.

À professora Regina Guenka (FORP – USP) pela colaboração com os experimentos de permeabilidade e microscopia confocal.

À CAPES pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste projeto de mestrado.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1 HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA .....	9
1.2 ESTRUTURA HIERÁRQUICA DA MATRIZ DENTINÁRIA .....	10
1.3 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA DENTINA .....	14
1.4 MECANISMOS DA SENSIBILIDADE DENTINÁRIA .....	17
1.5 TRATAMENTOS DESSENSIBILIZANTES.....	17
1.6 Sr <sup>2+</sup> NO TECIDO ÓSSEO E DENTINÁRIO.....	19
1.7 COLÁGENO TIPO I E REMINERALIZAÇÃO .....	21
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS.....	23
3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS .....	24
3.3 NANOPARTÍCULAS CARREADAS POR COLÁGENO TIPO 1 .....	25
3.4 OBTENÇÃO DOS DISCOS DE DENTINA .....	27
3.5 TRATAMENTOS POR APLICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS ASSOCIADO AO DESAFIO ÁCIDO .....	28
3.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS SUPERFÍCIES DENTINÁRIAS .....	29
3.7 APLICAÇÃO EM CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE POLPA DENTÁRIA HUMANA .....	32
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE HAP SUBSTITUÍDAS POR Sr <sup>2+</sup> ...	35
4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS DENTINÁRIOS MINERALIZADOS E DESMINERALIZADOS .....	48
4.3 TRATAMENTOS E CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DENTINÁRIAS .....	54
4.4 INVESTIGAÇÃO DE OBLITERAÇÃO DOS TÚBULOS E ENSAIO DE PERMEABILIDADE .....	69
4.5 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS EM CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE POLPA DENTÁRIA HUMANA (hDPSCs).....	76
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>

# Resumo

MACEDO, J. M. M. **Ação de nanopartículas de hidroxiapatita contendo estrôncio e carregadas por colágeno na remineralização e obliteração dos túbulos dentinários.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O objetivo foi avaliar a ação de nanopartículas de hidroxiapatita com incorporação de diferentes porcentagens de  $\text{Sr}^{2+}$  e carregadas por colágeno tipo I na remineralização e obliteração dos túbulos dentinários bem como seu efeito em células da polpa dental humana. Inicialmente foram sintetizadas nanopartículas de hidroxiapatita contendo porcentagens molares de  $\text{Sr}^{2+}$  de 0%, 10%, 50% e 100%. A fim de caracterizar as nanopartículas produzidas, realizou-se análises de difratometria de raios-x, microscopia eletrônica de varredura e transmissão, Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, Liberação de cálcio e Carga de superfície. Sequencialmente foram produzidos géis a partir da mistura das nanopartículas com solução de colágeno tipo I extraídos da cauda de camundongos, e géis a partir da mistura das nanopartículas com poli álcool vinílico para comparação. A etapa seguinte consistiu em obter discos de dentina a partir de terceiros molares humanos hígidos extraídos para aplicação dos géis de nanopartículas com colágeno tipo I e poli álcool vinílico. Os discos foram tratados com EDTA para suas características químicas e morfológicas estarem semelhantes ao tecido dentinário desmineralizado. Os discos foram então caracterizados química e morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura, Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, Energia livre de superfície, microscopia confocal, teste de permeabilidade e microdureza, sendo todas as caracterizações feitas antes e após as aplicações dos géis. As aplicações foram feitas segundo protocolo que incluía desafio ácido entre os tratamentos para simular as variações de pH no ambiente oral. Os resultados mostraram viabilidade na síntese de nanopartículas de hidroxiapatita com diferentes porcentagens de estrôncio incorporado, e alteração na estrutura cristalina resultante da presença do  $\text{Sr}^{2+}$ . Foi possível a formação de um gel contendo as nanopartículas com o colágeno tipo I, sem que este tivesse perda das fibrilas. Os tratamentos sobre os discos mineralizados indicaram maior efetividade para as nanopartículas carregadas por colágeno, em especial para as partículas contendo 50% de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado. As características físico-químicas e morfológicas foram restauradas, com exceção para a microdureza. A permeabilidade, o fator fundamental ao considerar hipersensibilidade, foi restaurada após os tratamentos das nanopartículas contendo colágeno. Os testes em células da polpa dentária humana indicaram que as nanopartículas não são tóxicas, bem como o aumento da formação de nódulos mineralizantes para as nanopartículas com total incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$ , além da indução da diferenciação osteogênica. Conclui-se que neste trabalho foi possível a obtenção de nanopartículas de hidroxiapatita por co-precipitação com tamanho nanométrico e com estrôncio incorporado bem como a formação de géis de nanopartículas com colágeno tipo I íntegro. Os tratamentos com os géis de colágeno foram eficientes na obliteração dos túbulos em comparação aos géis de PVA, além de os géis de colágeno restauraram a permeabilidade evidenciando também uma tendência à remineralização. As nanopartículas induziram a diferenciação osteogênica, e não inibiram a mineralização nem a viabilidade celular.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. Estrôncio. Dentina. Colágeno.



# Abstract

MACEDO, J. M. M. **Action of hydroxyapatite nanoparticles containing strontium and carried by collagen in the remineralization and obliteration of dentinal tubules.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The objective was to evaluate the action of hydroxyapatite nanoparticles incorporating different percentages of  $\text{Sr}^{2+}$  and carried by type I collagen in the remineralization and obliteration of dentinal tubules and the effect on human dental pulp cells. Initially, hydroxyapatite nanoparticles containing molar percentages of  $\text{Sr}^{2+}$  of 0%, 10%, 50% and 100% were synthesized. To characterize the produced nanoparticles, X-ray diffraction analysis, scanning and transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, calcium release and surface charge were performed. Gels were produced sequentially from the mixture of nanoparticles with collagen type I solution extracted from the tail of mice, and gels from the mixture of nanoparticles with polyvinyl alcohol for comparison. The next step consisted of obtaining dentin discs from sound human third molars extracted for application of nanoparticle gels with type I collagen and polyvinyl alcohol. The discs were treated with EDTA so that their chemical and morphological characteristics were like demineralized dentin tissue. The discs were then chemically and morphologically characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, surface free energy, confocal microscopy, permeability, and microhardness tests, with all characterizations being performed before and after gel application. Applications were made according to a protocol that included acid challenge between treatments to simulate pH variations in the oral environment. The results showed viability in the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles with different percentages of incorporated strontium, and alteration in the crystalline structure resulting from the presence of  $\text{Sr}^{2+}$ . It was possible to form a gel containing nanoparticles with collagen type I, without loss of fibrils. Treatments on mineralized disks indicated greater effectiveness for nanoparticles carried by collagen, especially for particles containing 50% of incorporated  $\text{Sr}^{2+}$ . The physical-chemical and morphological characteristics were restored, except for the microhardness. Permeability, the key factor when considering hypersensitivity, was restored after treatments with collagen-containing nanoparticles. Tests in human dental pulp cells indicated that the nanoparticles are not toxic, as well as increased formation of mineralizing nodules for nanoparticles with full incorporation of  $\text{Sr}^{2+}$ , in addition to the induction of osteogenic differentiation. It is concluded that in this work it was possible to obtain nanoparticles of hydroxyapatite by co-precipitation with nanometric size and with incorporated strontium, as well as the formation of gels of nanoparticles with intact type I collagen. Treatments with collagen gels were efficient in obliterating the tubules compared to PVA gels, in addition to collagen gels restoring permeability, also showing a tendency to remineralization. Nanoparticles induced osteogenic differentiation and did not inhibit mineralization or cell viability.

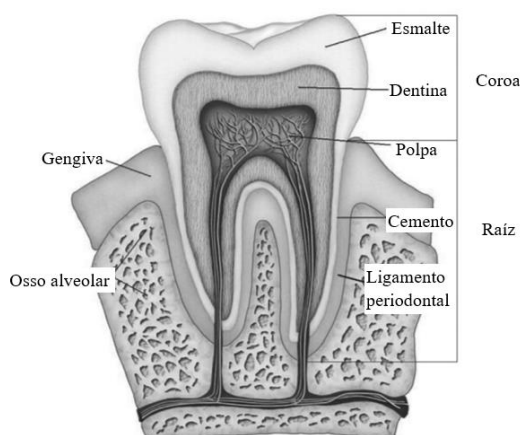
Keywords: Hydroxyapatite. Strontium. Dentin. Collagen.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA

Hipersensibilidade dentinária (HD) é uma condição clínica, a qual o dente torna-se sensível a estímulos externos de origem térmica, tátil, osmótica ou química, resultando em uma sensação de dor aguda, com curta duração<sup>1,2</sup>. Considerando os critérios para sua manifestação, a hipersensibilidade dentinária é classificada como síndrome dolorosa<sup>3</sup>. Esta manifestação clínica atinge um número considerável da população mundial (11,5%)<sup>4</sup> e pode afetar a qualidade de vida, uma vez que interfere em atividades cotidianas simples como comer, beber, falar, higiene bucal, e até mesmo em interações sociais<sup>5</sup>. Portanto, o estudo, entendimento e tratamento desta condição possui relevância significativa, sob o olhar clínico e social, uma vez que proporciona um impacto negativo na qualidade de vida dos portadores<sup>6</sup>.

A ocorrência de HD está associada à exposição da superfície dentinária e consequentemente dos túbulos dentinários<sup>7</sup>. Considerando a anatomia dentária (Figura 1), essa exposição pode ocorrer por retirada do esmalte ou cimento. A dentina, localizada na região da coroa, é revestida por um tecido altamente mineralizado chamado esmalte, de função protetora, e na região da raiz, a dentina é revestida por cimento<sup>8</sup>. Portanto, processos que causam exposição da dentina devido à perda de cimento e/ou esmalte, em teoria, acarretam a hipersensibilidade dentinária, o que garante à essa condição etiologia de variáveis diversas<sup>2</sup>.

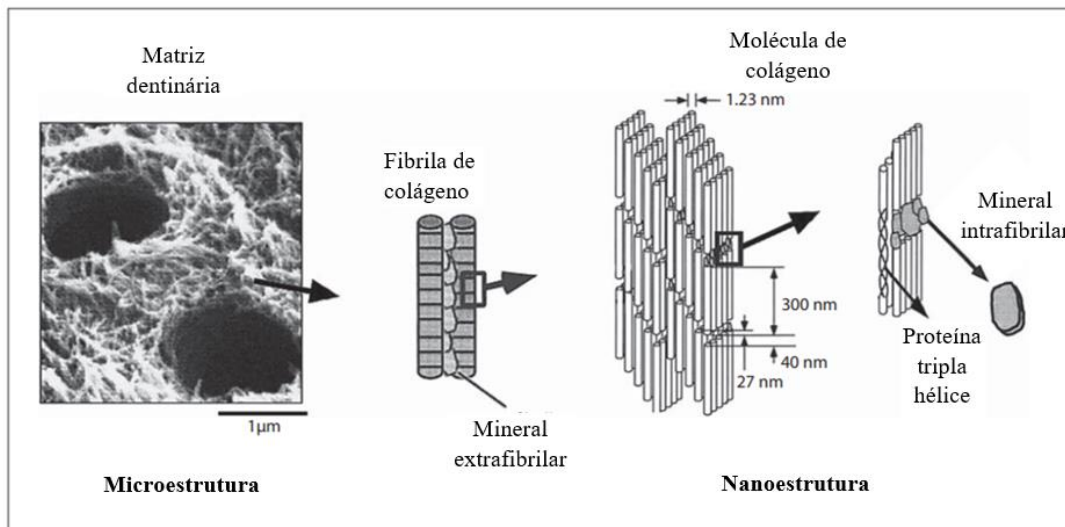


**Figura 1.** Imagem ilustrativa da anatomia dentária e os diferentes tecidos que a compõe. Imagem adaptada da referência 9.

A dentina é composta por uma fase mineral contendo fosfato de cálcio com estrutura e composição similares à da hidroxiapatita (HAp), e uma fase orgânica constituída de fibrilas de colágeno, principalmente tipo I (COL1) e macromoléculas não-colágenas<sup>10</sup>. Quando exposta, a dentina se torna suscetível às condições e variações de pH no ambiente oral, podendo ter sua sucessiva desmineralização causada pelo consumo de alimentos e bebidas ácidas, distúrbios alimentares e até refluxo esofágico<sup>11</sup>. Além da perda mineral, essas condições levam à exposição da matriz orgânica e alargamento dos túbulos dentinários tornando o dente suscetível à sensibilidade dentária.

## 1.2 ESTRUTURA HIERÁRQUICA DA MATRIZ DENTINÁRIA

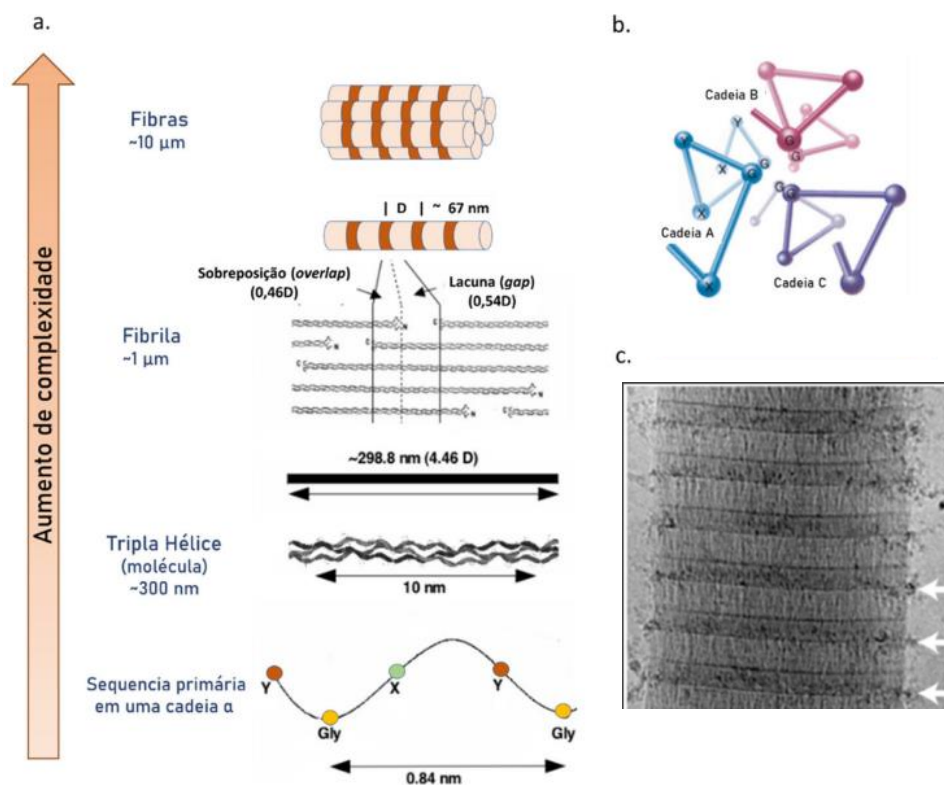
Muito do que se sabe a respeito dos componentes e estrutura de dentina foi adquirido a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* do tecido ósseo, devido as semelhanças entre composição e processo de mineralização<sup>12</sup>. Considerando a estrutura dentinária, a interação entre COL1 associado a proteínas não-colagenosas formam uma estrutura tridimensional ordenada e reforçada pela presença da fase mineral composta de HAp nanocristalina carbonatada, chamada apatita biológica. A apatita biológica pode ser classificada de acordo com o local em que se encontra na matriz colágena, sendo chamada de mineral extrafibrilar quando localizada nos espaços entre as fibrilas de colágeno e mineral intrafibrilar quando localizada nos espaços entre as moléculas de tropocolágeno<sup>13</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** A ilustração mostra a estrutura hierárquica da matriz dentinária considerando as dimensões microestruturais até sua organização nanométrica, indicando os níveis de mineralização das moléculas e fibrilas de colágeno tipo I. Imagem adaptada de referência 13.

O COL1 pertence a classe de colágeno fibrilar, e se destaca pela sua complexidade organizacional e funcional (Figura 3.a). A molécula de colágeno, também chamada de tropocolágeno, é formado por uma tripla hélice de três cadeias alfa ( $\alpha$ ), sendo duas do tipo  $\alpha_1(I)$  e uma do tipo  $\alpha_2(II)$ <sup>14</sup>. Cada uma destas cadeias possui aminoácidos em uma sequência específica e repetitiva da trinca glicina-X-Y, sendo que a glicina está necessariamente presente na terceira posição enquanto X/Y podem ser ocupados por diferentes aminoácidos, entretanto cerca de 22% são prolina ou hidroxiprolina. A presença da glicina na terceira posição proporciona o entrelaçamento entre as cadeias alfa para a formação da tripla hélice, e isso ocorre devido a glicina ser o aminoácido com menor cadeia lateral e ser projetada para dentro da hélice e, portanto, estabilizando a ligação entre as cadeias por interações fracas<sup>15</sup> (Figura 3.b).

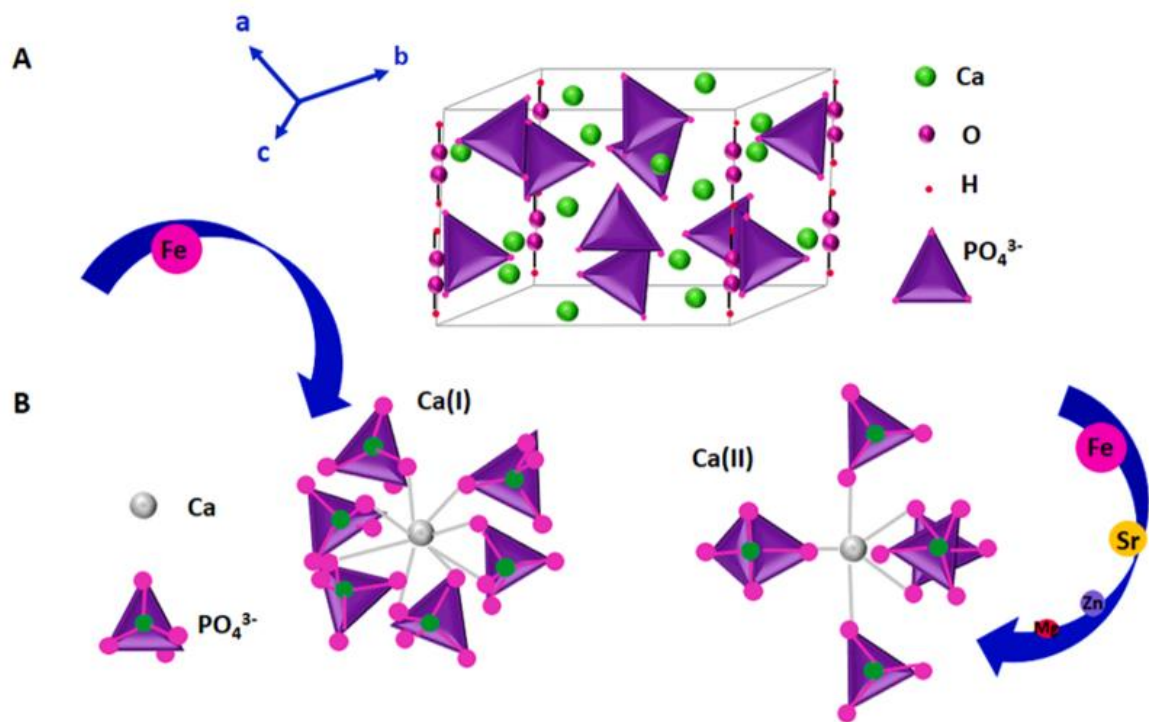
As moléculas de tropocolágeno se auto-organizam em arranjos supramoleculares que, no caso da matriz extracelular do tecido ósseo e dentinário, dão origem às fibrilas de COL1. Investigações utilizando microscopia eletrônica de transmissão mostraram a existência de um padrão nessas fibrilas, com repetição de bandas claras e escuras a cada 67 nm. Esse padrão é explicado pela interação entre moléculas de colágeno dispostas paralelamente, com sobreposição axial, bem como pelo espaçamento entre duas moléculas vizinhas, gerando então as regiões de sobreposição (*overlap*) e de lacuna (*gap*)<sup>16</sup> (Figura 3.c). Esse alto grau de ordenamento da estrutura colágena em conjunto com a fase mineral, proporciona as características físico-químicas e mecânicas aprimoradas desta matriz mineralizada<sup>17</sup>.



**Figura 3.** Diferentes níveis de organização do colágeno. **(a)** Aumento da complexidade do ordenamento entre as moléculas de colágeno desde a sequência primária de uma cadeia alfa, até a organização em fibras. **(b)** Representação das interações entre as cadeias polipeptídicas que formam o tropocolágeno demonstrando a posição da glicina no entrelaçamento das cadeias. **(c)** Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão da fibrila de colágeno mostrando os arranjos alternados de sobreposição e lacuna. Imagem adaptada da referência 18.

A fase mineral do tecido dentinário é composta por apatita carbonatada e se assemelha em composição e estrutura à HAP estequiométrica  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , de razão molar  $Ca/P = 1,67$ . A morfologia dos cristalitos na matriz dentinária pode variar de acordo com sua região, porém semelhantemente a matriz óssea, foi verificada na forma de placas e agulhas<sup>17</sup>. A HAP estequiométrica de estrutura cristalina hexagonal é classificada no grupo espacial  $P6_3/m$ , e possui célula unitária contendo 10 íons de cálcio localizados em dois sítios cristalográficos não equivalentes. Os quatro íons localizados na região denominada Ca(I) alinhados em coluna e seis íons localizados no sítio denominado Ca(II) organizados em triângulos equiláteros em planos perpendiculares ao eixo c. Os sítios de fosfato são equivalentes entre si formando uma unidade compacta (Figura 4).

A presença de dois sítios distintos para cálcio promove um ambiente flexível e, portanto, propício para substituições catiônicas e aniônicas o que justifica a apatita biológica possuir habilidade de incorporar alguns elementos em sua estrutura, e conseqüentemente afetar a morfologia, estabilidade e propriedades mecânicas da apatita dentinária. Os cátions mais comuns substituídos na apatita são o magnésio ( $Mg^{2+}$ ), estrôncio ( $Sr^{2+}$ ), zinco ( $Zn^{2+}$ ) e ferro ( $Fe^{2+}$ ). A possibilidade de variações nas composições catiônicas e aniônicas interfere nas propriedades cristalográficas, tornando-a contrastante da HAp estequiométrica<sup>17</sup>. Dependendo do cátion incorporado, os parâmetros de rede podem aumentar ou diminuir, bem como causar aumento ou diminuição da cristalinidade da apatita<sup>17</sup>.



**Figura 4.** (a) Representação da estrutura cristalina da hidroxiapatita estequiométrica (b) Sítios de cálcio e os elementos de substituição possíveis. Extraído da Referência 17.

### 1.3 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA DENTINA

O tecido dentinário é um tecido mineralizado semelhante ao tecido ósseo em termos de composição e mecanismos de formação. Constitutivamente, ambos são biocompósitos contendo COL1, como maior componente da matriz orgânica, e proteínas não-colagenosas, em uma estrutura altamente ordenada e complexa agregando cristais de apatita biológica. O processo formativo de ambos ocorre em etapas sucessivas a partir de uma matriz extracelular (pré-dentina e osteóide) que em passos progressivos formam fibrilas de colágenos mineralizadas<sup>10</sup>.

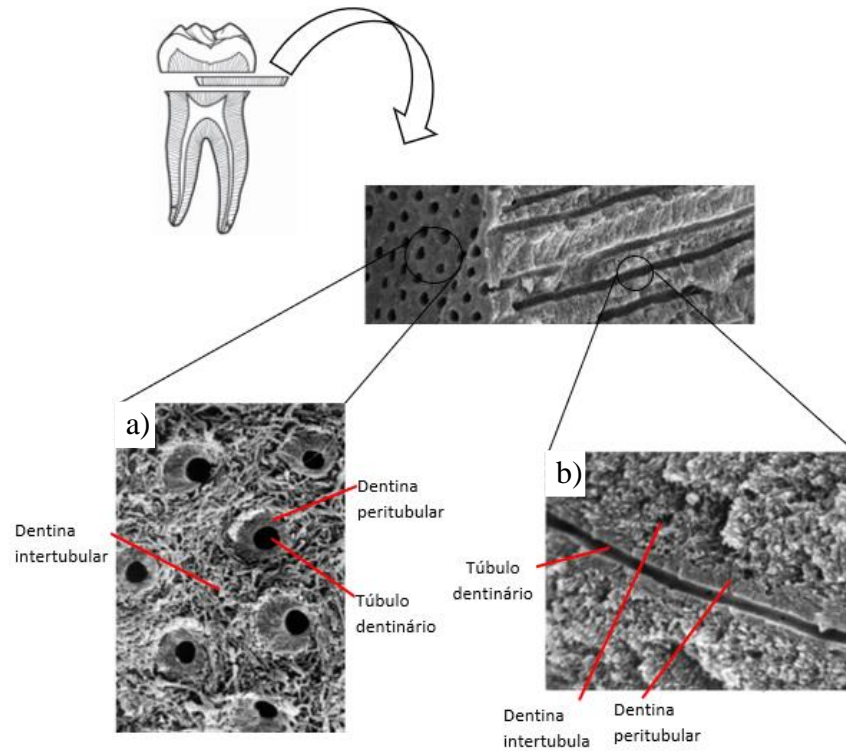
Apesar dessas semelhanças estruturais, diferenças morfológicas e metabólicas separam ossos e dentina. O osso é um tecido dinâmico e continuamente remodelado, enquanto a dentina não apresenta remodelação<sup>10</sup>. Enquanto as células ósseas são renovadas por ciclos de proliferação e diferenciação, os odontoblastos são células pós-mitóticas<sup>19</sup>. Outra diferença é que a dentinogênese é um processo de deposição contínua de tecido mineralizado se deslocando para polpa, sendo que o corpo celular nunca fica preso na matriz diferentemente do que ocorre com o osteócito na formação óssea<sup>10</sup>.

Sob o ponto de vista biológico, o tecido dentinário é uma barreira semipermeável alocada entre o esmalte e a polpa, e em algumas situações entre a polpa e a superfície externa, exposta por alguma lesão. Sob o ponto de vista microestrutural e biomecânico, as fibrilas de colágeno mineralizadas que compõe a matriz dentinária, atuam como suporte para o esmalte circundante, preservando a função do dente ao lhe proporcionar a resiliência necessária impedindo fraturas na coroa dentária.<sup>11</sup>

A dentina é um tecido avascular e constitui a maior parte do volume do dente. Contém em toda sua extensão, túbulos resultantes da diferenciação odontoblástica e da mineralização da matriz dentinária durante o crescimento do dente.<sup>7,20</sup> Mesmo após sua formação, esses túbulos abrigam as extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, que se localizam alinhados ao longo da superfície interna da dentina formando os limites periféricos da polpa dentária<sup>20</sup>.

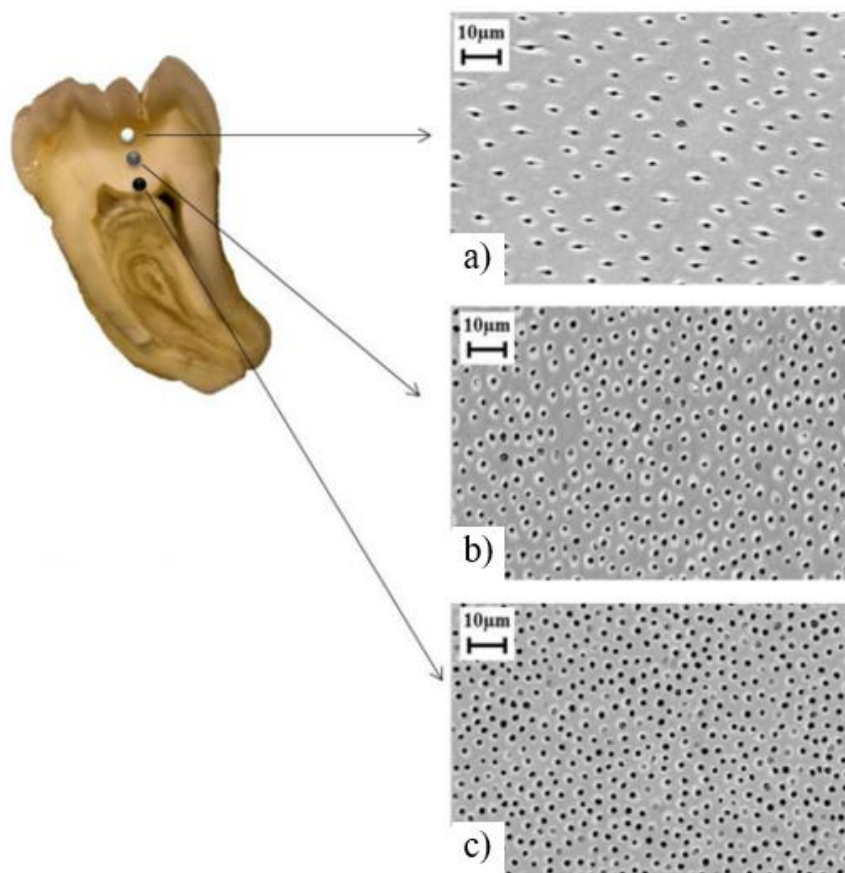
Dentre os tipos de tecido dentinário, a dentina circumpulpar é a maior constituinte, sendo subdividida em dentina peritubular e dentina intertubular<sup>21</sup> (Figura 5). A dentina peritubular é hipermineralizada e constitui as paredes dos túbulos dentinários, e seu grau de hipermineralização está associado à idade do dente<sup>22</sup>. Os túbulos possuem variações de

diâmetro ao longo da seção transversal como consequência do processo de dentinogênese. Próximos a junção amelodentinária, o diâmetro dos túbulos possui em torno de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, enquanto próximos e região da pré-dentina podem chegar a 2,5  $\mu\text{m}$ <sup>21</sup> (Figura 6).



**Figura 5.** Micrografias eletrônica do tecido dentinário. Superfície (a) e corte transversal (b). É possível notar a diferença entre as diferentes regiões intertubulares e peritubulares. Imagem adaptada das referências 21, 23 e 24.





**Figura 6.** Micrografias eletrônicas de diferentes regiões da dentina coronária de um terceiro molar: região mais próxima ao esmalte e da junção amelodentinária (a); região central (b); região mais próxima à polpa e à pré-dentina (c). O número de túbulos dentinários por área aumenta quanto mais próxima a dentina está da polpa, como consequência do sentido radial de desenvolvimento dos túbulos dentinários pelos odontoblastos. Imagem adaptada da referência 22.

Os odontoblastos possuem papel primordial no desenvolvimento dentinário. Essas células são encontradas na periferia da polpa dentária e possuem extensões citoplasmáticas que se estendem por toda dentina<sup>25</sup>. Além de serem responsáveis pela secreção dos componentes da dentina, principalmente durante a fase de desenvolvimento do dente, os odontoblastos continuam a modificar este tecido no decorrer da vida. Danos causados na dentina podem ser auto-reparados de forma a proteger a polpa dentária<sup>25</sup>, o que constata seu importante papel no contexto de remineralização. Portanto, é importante considerar os dois tecidos como em trabalho conjunto, principalmente ao considerar que a polpa tem como funções básicas formar, nutrir, proteger e reparar a dentina<sup>20</sup>. Uma vez que presença dos odontoblastos torna a dentina um tecido sensível e capaz de ser reparado, em termos da formação e manutenção do tecido dentinário, é importante considerar a interdependência do complexo dentina-polpa<sup>20</sup>.

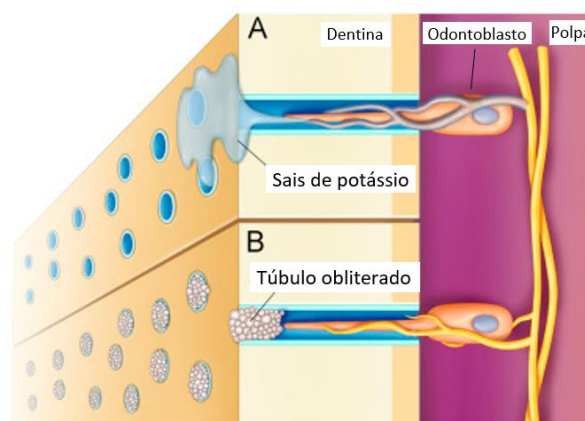
#### 1.4 MECANISMOS DA SENSIBILIDADE DENTINÁRIA

Algumas teorias já foram propostas para elucidar o mecanismo responsável pela sensação de dor que causa HD. Dentre elas a teoria da transdução odontoblástica prevê que os prolongamentos odontoblásticos da dentina reagem aos estímulos externos, produzindo neurotransmissores para os nervos e causando dor<sup>26</sup>. As extensões citoplasmáticas dos odontoblastos ficam próximas às fibras nervosas sensoriais, apoiando a ideia de que odontoblastos possam detectar estímulos externos e sinalizar para as células nervosas próximas, entretanto os mecanismos envolvidos não são totalmente elucidados<sup>27,28</sup>. Outra teoria, chamada de teoria neural propõe que os estímulos externos afetam diretamente as terminações nervosas no interior dos túbulos dentinários que se comunicam diretamente com os nervos das fibras pulpares<sup>26</sup>.

A teoria mais aceita é a Teoria Hidrodinâmica de Bränstöröm que justifica a hipersensibilidade como consequência do movimento do fluido nos túbulos da dentina devido a estímulos externos, provocando deformação das fibras nervosas, e gerando a sensação de dor<sup>7,29,30</sup>. Dentes condicionados a hipersensibilidade dentinária apresentam túbulos expostos e de diâmetro aumentado em comparação aos túbulos de dentes sem hipersensibilidade, corroborando para justificar que o aumento de fluxo do fluido está diretamente ligado a sensação de dor<sup>31</sup>.

#### 1.5 TRATAMENTOS DESSENSIBILIZANTES

As modalidades de tratamento para HD incluem agentes anti-inflamatórios, compostos que cubram ou obstruam os túbulos dentinários, lasers, materiais restauradores, e cirurgia periodontal<sup>26</sup>. Destas variedades existentes, as formas de tratamento incluem produtos de uso restrito à aplicação por profissionais, ou aqueles de autoaplicação como é o caso dos dentifrícios<sup>31</sup>. Esses produtos podem ser divididos em dois grupos de acordo com o mecanismo de ação: bloqueio da resposta nervo-pulpar ou obliteração os túbulos da dentina<sup>30,32,33</sup> (Figura 7).



**Figura 7.** Imagem ilustrativa dos dois mecanismos de ação de agentes dessensibilizantes aplicados no tecido dentinário. **(a)** Sais de potássio bloqueando a resposta nervo-pulpar. **(b)** Obliteração do túbulo dentinário impedindo a movimentação do fluido tissular. Imagem adaptada da referência 7.

Visto que a exposição dos túbulos são a causa da hipersensibilidade devido a movimentação dos fluidos tissulares, segundo a teoria hidrodinâmica, um tratamento considerado ideal para esta condição deve restaurar a permeabilidade original e característica do tecido dentinário mineralizado, e algumas vezes isso é alcançado por meio da total obliteração dos túbulos, mineralização intratubular ou mesmo com a formação de dentina terciária<sup>7</sup>. Entretanto, deve-se levar em consideração que a existência do túbulo dentinário colabora diretamente para o mecanismo de defesa do complexo dentina-polpa, uma vez que em seu interior estão dispostas imunoglobulinas capazes de impedir ação bacteriana, diminuindo a difusão de antígenos bacterianos ou toxinas e ligando-se a anticorpos específicos<sup>34</sup>. Bem como, por meio dos túbulos, terminações nervosas presentes conseguem detectar diferentes estímulos mecânicos e variações na temperatura e, portanto, proteger a polpa de lesões<sup>35</sup>. Sendo assim, cabe considerar que a manutenção da integridade do túbulo é significativa para a possibilidade de comunicação do complexo dentina-polpa. Desta forma, deve-se levar em consideração que o bloqueio tubular total, impedindo a permeação de fluidos por estes canais deve ser evitada.

Dessensibilizantes que atuam bloqueando a resposta nervo pulpar já são utilizados, em forma de cremes dentais e enxaguantes bucais, contendo principalmente sais de potássio: nitrato de potássio, cloreto de potássio ou citrato de potássio<sup>7</sup>. O potássio é um típico controlador de transmissão nervosa, portanto, a aplicação de sais de potássio eleva a concentração extracelular deste íon nos túbulos dentinários, garantindo a despolarização da sinapse nervosa impedindo a condução do impulso da dor<sup>36</sup>. Esse modo de atuação não altera a movimentação do fluido

tissular, bloqueando apenas a resposta nervo pulpar, sendo característico desse tratamento apenas alívio parcial e de curta duração<sup>7</sup>.

Alguns outros métodos de obliteração ou forma de selar a dentina são métodos que incluem laser e cirurgia plástica mucogengival<sup>36</sup>. Ainda, a literatura aponta uma variedade de agentes dessensibilizantes usados em dentifrícios que atuam via obstrução dos túbulos dentinários, dos quais possuem como componentes ativos o fluoreto de sódio, fluoreto de estanho, cloreto de estrôncio, oxalato de potássio, fosfato de cálcio, carbonato de cálcio, formaldeído, glutaraldeído entre outros<sup>1,29,31-33,36-39</sup>. Há relatos ainda da utilização de ionômero de vidro, resina composta e adesivo dentinário atuantes como selantes. No caso especial do  $\text{Sr}^{2+}$ , seu uso como agente dessensibilizante ocorre na forma de acetato, conforme composição do creme dental Sensodyne Alívio Rápido®, que há anos é o produto de maior comercialização para este fim<sup>39</sup>.

#### 1.6 $\text{Sr}^{2+}$ NO TECIDO ÓSSEO E DENTINÁRIO

Por possuir um raio atômico relativamente próximo ao cálcio, uma vez que ambos estão na família dos alcalino terrosos, o  $\text{Sr}^{2+}$  torna-se um bom substituinte do cálcio na matriz inorgânica da hidroxiapatita e já é verificada naturalmente como um elemento traço do tecido dentinário.<sup>40</sup> O corpo humano não apresenta  $\text{Sr}^{2+}$  naturalmente, sendo este proveniente da dieta e da água. Estima-se que a pessoa consome em média 1 a 5 mg de  $\text{Sr}^{2+}$  por dia em alimentos como raízes, vegetais de folhas verdes, frutos do mar e leguminosas<sup>40</sup>.

Estudos na literatura indicam que o  $\text{Sr}^{2+}$  é capaz de atuar de maneira significativa na remodelação óssea melhorando a atividade de osteoblastos, podendo ser usado para o tratamento de doenças como osteoporose<sup>41,42</sup>. Ainda,  $\text{Sr}^{2+}$  mostra considerável relevância por algumas propriedades específicas como estimular a dentinogênese e, portanto, fundamental para manutenção das propriedades fisiológicas e mecânicas deste tecido. Este cátion também está relacionado à inibição da expressão de metaloproteinases de matriz, significando que promove a redução na degradação do colágeno. Estudos evidenciaram que o  $\text{Sr}^{2+}$  possui importância no aumento da proliferação, diferenciação e mineralização celular em células da polpa dentária de camundongos e humanos<sup>43,44</sup>.

Dentifrícios contendo  $\text{Sr}^{2+}$  para o tratamento da hipersensibilidade dentinária foram inicialmente usados como cloreto de estrôncio, e em suas formulações mais recentes encontrado

como acetato de estrôncio. Tanto o cloreto quanto o acetato atuam sobre a superfície a dentina formando depósitos cristalinos capazes de obliterar os túbulos, entretanto estes podem ser facilmente removidos devido sua alta solubilidade, que é intensificada com as variações de pH oral, tornando os efeitos clínicos destes sais de  $\text{Sr}^{2+}$  limitados como agente ativo<sup>33</sup> e, portanto, tornando a eficácia destes controversa na literatura<sup>1</sup>.

A incorporação do  $\text{Sr}^{2+}$  em partículas menos solúveis é uma alternativa para otimizar sua eficácia. HAp nanométricas já são utilizadas em alguns dentifrícios para tratar a HD<sup>45</sup>, pois possuem baixa solubilidade e biocompatibilidade com a fase inorgânica do tecido dentinário/ósseo<sup>46</sup>. Geevarghese et. al. investigaram o efeito da aplicação de um creme de HAp nanométrica dopada com  $\text{Sr}^{2+}$  nas porcentagens de 10% e 20% e carregada por quitosana, constatando que a pasta contendo 20% de  $\text{Sr}^{2+}$  promoveu remineralização e aumento das propriedades mecânicas da dentina parcialmente desmineralizada. Entretanto, este estudo *in vitro* não verificou a eficácia da pasta sob condições ácidas, ou seja, em condições que tornam os dessensibilizantes comerciais limitados em sua eficácia<sup>46</sup>. Considerando a resposta celular de osteoblastos e osteoclastos, nanoestruturas de HAp substituídas com  $\text{Sr}^{2+}$  e funcionalizadas com zoledronato, fármaco utilizado para combater a osteoporose, foram aplicadas em cultura de osteoblastos e osteoclastos para investigar os efeitos. Resultados mostraram que a aplicação dessas nanoestruturas causou aumento da proliferação e diferenciação destes osteoblastos devido a presença de  $\text{Sr}^{2+}$ , e inibição da formação e diferenciação de osteoclastos relacionadas a presença do zoledronato<sup>42</sup>.

A aplicação direta de partículas e moléculas bioativas possui eficácia limitada por uma gama de fatores que incluem direcionamento não específico, dificuldade de estabilidade fisiológica e dificuldade para atravessar a membrana para acesso intracelular<sup>47</sup>. O uso de carreadores visam suprir essas dificuldades buscando estabilizar as moléculas ou partículas bioativas, direcionando sua entrega, permitindo uma liberação controlada e facilitando a entrada na célula. Polímeros naturais tem sido utilizados com este propósito, como a quitosana usada como carreadora na entrega de proteínas osteogênicas e proteínas morfogênicas ósseas (BMP). Exemplos de polímeros sintéticos biodegradáveis também são encontrados, entretanto os naturais possuem vantagem devido a biocompatibilidade e biodegradabilidade<sup>12</sup>.

## 1.7 COLÁGENO TIPO I E REMINERALIZAÇÃO

É importante considerar a contribuição da matriz orgânica no contexto de mineralização e hipersensibilidade dentinária. Essa matriz, constituída de COL1 e macromoléculas não-colagênicas, é fundamental para o processo de biomineralização, interagindo com íons minerais para a produção de nanoestruturas híbridas cristalograficamente ordenadas<sup>48</sup>. O COL1 compõe a maior parte da matriz orgânica, servindo como suporte mecânico para os cristais minerais, reforçando a resistência<sup>13</sup> além de possuir relevante importância para o processo de remineralização da dentina<sup>49,50</sup>.

Yang et al. em sua revisão discutiram a organização do colágeno em diversas estruturas, ilustrando suas arquiteturas, resistência, deformação e mecanismos de resistências, bem como sistemas naturais servem de base para materiais sintéticos biomiméticos<sup>51</sup>. O processo de desmineralização e remineralização da dentina foi avaliada por Di Foggia et al., que em seu trabalho, observou-se que o processo de desmineralização da dentina ocorre sem perda de colágeno, que manteve sua habilidade de ligar cálcio nas condições do experimento, se reorganizando em uma estrutura semelhante à dentina mineralizada<sup>48</sup>.

A matriz orgânica exposta na superfície dentinária, como consequência de um ataque ácido, é capaz de interagir com polímeros bioadesivos por meio de ligações químicas<sup>52</sup>. Na literatura<sup>53</sup> investigaram a utilização de nanopartículas (NPs) de acetato de Sr<sup>2+</sup> revestidos com COL1 para a obliteração dos túbulos da dentina. Avaliações feitas por microscopia eletrônica de varredura concluíram a obliteração dos túbulos após aplicações do agente em teste. Avaliações químicas da dentina tratada com as NPs foram analisadas em sua morfologia e composição, constatando sua capacidade em obstruir os túbulos dentinários.

Desta forma, considerando os fatores que promovem a HD, bem como os tratamentos já existentes e suas limitações, esse projeto tem como propósito investigar o possível potencial remineralizador e obliterador de NPs de HAp com diferentes porcentagens de Sr<sup>2+</sup> incorporados e associadas a um biopolímero (COL1), quando aplicadas sobre a superfície de tecido dentinário desmineralizado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação de nanopartículas (NPs) de HAp, com diferentes porcentagens de incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$ , carregadas com colágeno, na obliteração dos túbulos e remineralização da matriz dentinária, e o efeito das NPs em células de polpa dental humana (hDPSCs) .

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Síntese e caracterização de NPs de hidroxiapatita com diferentes porcentagens de substituição de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Sr}^{2+}$ , por método de precipitação via úmida;
2. Obter géis contendo essas NPs e COL1 a partir de soluções de COL1;
3. Obter discos de dentina a partir de terceiros molares humanos para aplicação das NPs carregadas por COL1;
4. Caracterizar morfológicamente e quimicamente os discos de dentina, antes e após os tratamentos;
5. Verificar a permeabilidade dentinária dos discos de dentina mineralizados, desmineralizados e após os tratamentos;
6. Investigar a microdureza da dentina após os tratamentos;
7. Quantificar o número de túbulos obliterados após aplicação dos géis contendo NPs;
8. Estudar os efeitos das NPs em cultura de hDPSCs;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

Neste projeto as NPs de hidroxiapatita substituídas por  $\text{Sr}^{2+}$  (%SrHAp) foram obtidas pelo método de precipitação química por via úmida, que foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa<sup>74</sup>. As soluções foram preparadas utilizando água deionizada a partir de um sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Tensão superficial ( $\gamma$ ) = 72,8 mN/m e resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm). Para a precipitação das NPs foram utilizadas soluções contendo  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Synth, Diadema, SP., Brasil),  $\text{SrCl}_2$  (Synth, Diadema, SP., Brasil),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich, San Luis, MO., Estados Unidos),  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Synth, Diadema, SP., Brasil).

Misturas entre soluções de cloreto de cálcio e estrôncio foram preparadas com diferentes porcentagens molares de  $\text{Sr}^{2+}$  em relação ao  $\text{Ca}^{2+}$  considerando o número total de mols ( $\text{Sr}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$ ) com concentração total  $[\text{Sr}^{2+}] + [\text{Ca}^{2+}] = 0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ . A partir destas variações molares foram obtidas nanopartículas com incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$  nas porcentagens de 0%  $\text{Sr}^{2+}$  (0%SrHAp), 10%  $\text{Sr}^{2+}$  (10%SrHAp), 50%  $\text{Sr}^{2+}$  (50%SrHAp) e 100%  $\text{Sr}^{2+}$  (100%SrHAp) (Tabela 1). Estas soluções foram submetidas a agitação, utilizando um ultraturrax (22.000 rpm, 10min), misturadas com a solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  na concentração de  $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$  para a obtenção de uma razão molar Ca/P igual a 1,67, que é característica da HAp estequiométrica. Ainda sob agitação, foi realizado ajuste do pH para obtenção de um meio básico (pH~9), com a adição da solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  de concentração  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , favorecendo a precipitação mineral. A mistura foi mantida sob agitação utilizando-se agitação magnética durante 1 hora, e o precipitado obtido filtrado em papel filtro qualitativo, lavado com água deionizada e seco em estufa ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Parte das partículas obtidas foi submetida a tratamento térmico a  $600 \text{ }^\circ\text{C}$  por 8h.

**Tabela 1.** Nomenclatura das NPs de HAp de acordo com a quantidade de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado.

Quantidade de $\text{Sr}^{2+}$	NPs
0%	0%SrHAp
10%	10%SrHAp
50%	50%SrHAp
100%	100%SrHAp



## 3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS

### 3.2.1 Difratometria de raios-X

A estrutura das NPs foi investigada por meio de difratometria de raios-X, utilizando um equipamento Bruker-AXS D2 Phaser (DQ-FFCLRP) com radiação Cu K $\alpha$   $\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$  (10 mA, 30 kV), em uma faixa de varredura de  $2\theta$  de  $10^\circ$  a  $60^\circ$ . Os picos dos difratogramas foram comparados a padrões obtidos a partir dos bancos de dados American Mineralogist Crystal Structure Database (AMCSD) e Crystallography Open Database (COD). Uma vez obtidos os difratogramas, foi utilizada a equação de Scherrer para verificar o tamanho do cristalito na direção do plano (002), pico localizado na faixa de  $24\text{-}27^\circ$ . Este pico foi ajustado com uma função pseudo-Voigt para obtenção da largura à meia altura ( $\beta$ )

$$D_{hkl} = \frac{K \lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

Na equação,  $D_{hkl}$  é o tamanho do cristalito (nm),  $K$  é uma constante da forma da partícula,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação CuK $\alpha$  incidente e  $\theta$  é o ângulo de difração na reflexão de Bragg.

### 3.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada em Fourier (FTIR)

Foi utilizado FTIR, com um acessório de reflexão total atenuada (ATR) acoplado, para caracterização da composição das partículas por meio da identificação dos grupos químicos com vibração característica na faixa de  $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ . Foi utilizado o espectrofotômetro IR Prestige-21 Shimadzu (Laboratório de Atividade Biológica e Química Supramolecular de Compostos de Coordenação-DQ-FFCLRP), com acessório de ATR acoplado.

### 3.2.3 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e transmissão (TEM)

Avaliação morfológica das NPs foi feita por MEV em um microscópio Superscan SS-550 Shimadzu (DQ-FFCLRP), com aceleração de voltagem de 20 kV. Para obtenção das imagens as amostras foram recobertas com ouro pelo método de pulverização catódica (Bal-Tec, SCD-050 Sputter Coater). As NPs foram submetidas também a análise de morfologia pela técnica de MET utilizando o microscópio MET JEM 100CXII da JEOL equipado com a câmera digital Hamamatsu ORCA-HR (Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica-LMME-FMRP).

### 3.2.4 Carga de superfície

Buscando verificar a carga de superfície das NPs em dispersão aquosa, foi realizada medidas de potencial-zeta ( $\zeta$ ) utilizando um ZetaSizer Malvern Nano ZS, Malvern Instruments (Laboratório de Físico-Química de Colóides e Superfícies -DQ-FFCLRP). Foram preparadas dispersões de NPs em meio aquoso na concentração 6 mg/mL, e agitadas mecanicamente por 2 minutos. Desta solução, 10  $\mu$ L foram diluídos em 1 mL de água deionizada, a 25°C, e então submetidas a análise. O  $\zeta$  é calculado pelo instrumento a partir da mobilidade eletroforética ( $U$ ) das NPs, segundo a equação de Smoluchowski.

$$\zeta = \frac{U\eta}{\varepsilon}$$

Na equação,  $\zeta$  é o potencial zeta,  $U$  é a mobilidade eletroforética,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $\varepsilon$  é a constante dielétrica.

### 3.2.5 Medidas de liberação de $\text{Ca}^{2+}$

Medidas de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir das NPs em meio aquoso foram feitas por meio do eletrodo íons seletivo para cálcio SysCroma (Laboratório de Físico-Química de Colóides e Superfícies -DQ-FFCLRP) durante o período de 24h. Foram preparadas dispersões aquosas de NPs nas concentrações de 1 mg/mL, e mantidas sob baixa agitação (100 rpm) em temperatura ambiente. Para realizar as medidas com o eletrodo seletivo, as soluções eram centrifugadas (2000 rpm) e o sobrenadante separado para serem feitas a leituras. Após a leitura, as NPs eram ressuspensas e submetidas novamente a baixa agitação para subseqüente leitura do intervalo de tempo determinado. A partir dos potenciais caracterizados por uma curva padrão obtidos de uma solução de  $\text{CaCl}_2$ , as concentrações de cálcio foram determinadas a partir dos potenciais das soluções de NPs após 1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h de agitação.

## 3.3 NANOPARTÍCULAS CARREADAS POR COLÁGENO TIPO 1

Para obtenção das NPs carreadas com COL1, foi necessário inicialmente obter a solução de COL1 a partir de caudas de camundongos sacrificados para outros fins experimentais, que foram cedidas pelo biotério do Hemocentro de Ribeirão Preto. O protocolo experimental consistiu na extração a partir dos tendões que foi baseada em protocolo já estabelecido na

literatura<sup>54</sup>. Brevemente, os tendões foram extraídos das caudas e solubilizados em solução de ácido acético 0,5 mol.L<sup>-1</sup> por 24 horas, a 4°C, em agitação magnética branda. Sequencialmente, foram centrifugados para separar as partes não solúveis em ácido a 10000 g por 30 min, a 4°C. Então, o COL1 foi precipitado com adição de NaCl 0,7 mol.L<sup>-1</sup> seguido de agitação por 24 h. O precipitado foi então separado por centrifugação a 10000 g por 30 min, a 4°C e posteriormente solubilizado em ácido acético 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. A solução resultante foi dialisada em solução de ácido acético 0,5 mol.L<sup>-1</sup> por uma semana, usando membrana com poros de tamanho para proteínas com massas maiores que 3400 kD. A concentração de colágeno na solução resultante foi determinada usando-se o protocolo de Komsa-Penkova, et al.<sup>55</sup>.

O processo de incorporação das NPs nas fibrilas de COL1 foi iniciado com a ressuspensão das NPs em 1 ml de água deionizada, que então foi ultrassonicada e mantida sob agitação. Foram então coletados 1 mL da solução de COL1 (1,2 mg/mL) e mantido sob lenta agitação, para então elevação do pH da solução (pH 3,75) com NaOH (0,5 mol/L) até a solução atingir pH 7. Este processo foi feito em banho de gelo para evitar a degradação das fibrilas devido ao aumento da temperatura provocado pela introdução do NaOH na solução. Nesta solução de COL1 com pH 7, foi misturada a suspensão de NPs, e a nova solução mantida em agitação branda por 10 min. A mistura foi então filtrada, restando no filtro o gel de COL1 com NPs, que foi separado e mantido em geladeira.

Foram utilizados géis de NPs com poli álcool vinílico (PVA) para fins de comparação entre o COL1 e um polímero que não fosse componente do tecido dentinário. A eficácia do PVA foi investigada pelo nosso grupo de pesquisa constatando a eficiência deste polímero sintético como carreador de NPs de carbonato de cálcio na obliteração de túbulos dentinários.<sup>56</sup> Para preparo destes géis dissolveu-se 10% em massa de PVA em água deionizada, que foi então armazenado por 24h para seu intumescimento. Realizou-se então o aquecimento até 90°C durante 2h para formação do gel. Após o resfriamento, as NPs foram adicionadas de forma a obter 30% em massa de partículas no gel, que foi mantido sob agitação para homogeneização. Após obtenção dos géis de COL1 e PVA com NPs, cada gel foi nomeado segundo a tabela 2.

**Tabela 2.** Nomenclatura utilizada para cada variedade de NP carregadas com PVA e COL1.

<b>NPs</b>	<b>Polímero</b>	<b>Géis</b>
0%SrHAp	COL1	<b>0%SrHAp-COL</b>
10%SrHAp	COL1	<b>10%SrHAp-COL</b>
50%SrHAp	COL1	<b>50%SrHAp-COL</b>
100%SrHAp	COL1	<b>100%SrHAp-COL</b>
0%SrHAp	PVA	<b>0%SrHAp-PVA</b>
10%SrHAp	PVA	<b>10%SrHAp-PVA</b>
50%SrHAp	PVA	<b>50%SrHAp-PVA</b>
100%SrHAp	PVA	<b>100%SrHAp-PVA</b>

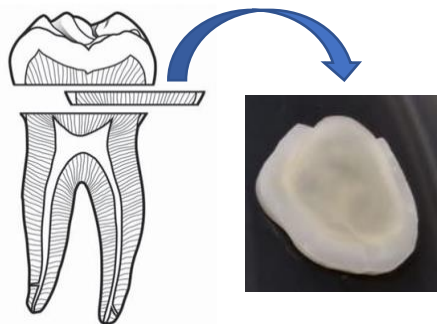
### 3.4 OBTENÇÃO DOS DISCOS DE DENTINA

Os discos de dentina (Figura 8) foram obtidos a partir de terceiros molares humanos hígidos extraídos e armazenados (solução de timol 0,5% a 4°C) e provenientes do Biobanco de dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP), aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (06245218.2.0000.5419) da mesma instituição.

Para obtenção dos discos, os dentes foram acrilizados com resina acrílica autopolimerizável Jet Clássico (Dencor®, Metil Metacrilato – Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil). Utilizando uma máquina de corte de precisão (IsoMet® 1000, Buehler, Illinois, EUA – Departamento de Odontologia Restauradora da FORP/USP) foram feitos cortes com aproximadamente 1 mm de espessura na região abaixo da junção amelodentinária para obtenção de discos da dentina coronária, com os túbulos dentinários dispostos perpendicularmente a superfície dentinária exposta (Figura 8). Buscando dar acabamento, polimento e padronização das superfícies dos discos, estas foram então polidas com lixas d'água para polimento P1200 (3M) e P2000 utilizando a Politriz Buehler (Beta Grinder-Polisher – Departamento de Odontologia Restauradora da FORP/USP) com velocidade de 300 rpm. Este polimento foi feito nas faces onde foram aplicados os tratamentos com nanopartículas.

Os discos foram então sonicados em Lavadora Ultrassônica (ALT Sonic Clean) por 30 segundos em água deionizada e posteriormente imersos em ácido cítrico 6%, por dois minutos, para retirada da lama dentinária e resquícios do corte e polimentos<sup>56</sup>. Após o condicionamento

em ácido cítrico, os discos foram imersos em água deionizada e sonicados por 10 minutos para retirada de resquícios superficiais remanescentes. Após obtenção, os discos foram armazenados em 0,5 ml de saliva artificial, composta de carboximetilcelulose de sódio (10,0g), metilparabeno (2,0g),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,059g), KCl (0,625g),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,166g),  $K_2HPO_4$  (0,804g),  $KH_2PO_4$  (0,326g) em 1000 mL de água destilada<sup>56</sup>. Durante os experimentos, os discos imersos em saliva ficaram em banho com temperatura controlada de  $37 \pm 1^\circ C$ . Para cada análise foram utilizados três discos de dentina (n=3).



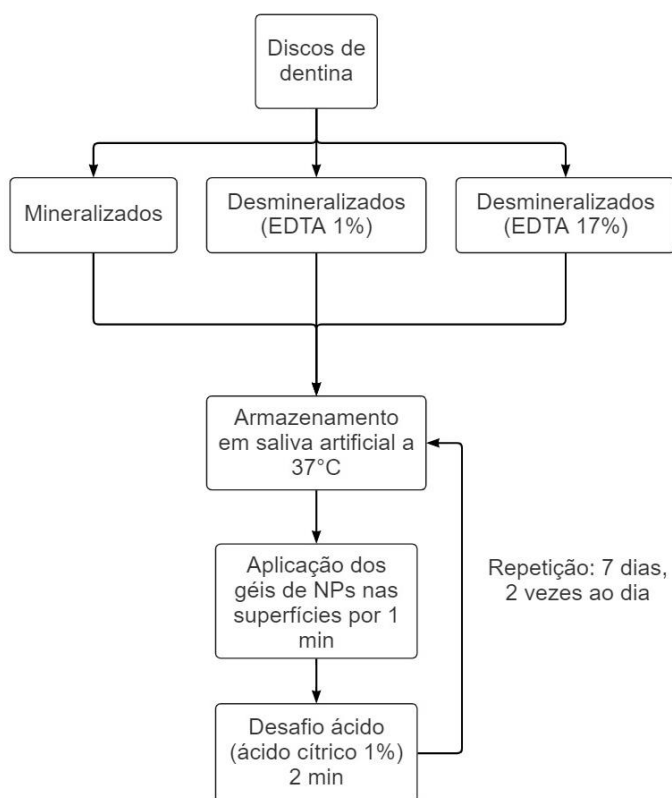
**Figura 8.** Imagem ilustrativa do corte feito em um terceiro molar, resultando em um disco de 1 mm de espessura. A região amarelada é dentina, e as bordas brancas correspondem ao esmalte da coroa.

Para verificar a eficácia dos tratamentos propostos para a obliteração de túbulos dentinários, foram investigados os efeitos das aplicações sob superfícies em diferentes condições: mineralizadas, estágios iniciais de desmineralização e estágios avançados de desmineralização. Para os estágios iniciais de desmineralização foi utilizado ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1% e para os estágios mais avançados foi utilizado EDTA 17%<sup>90</sup>. Neste processo desmineralizante, os discos de dentina foram imersos nas soluções de EDTA durante 2h, e posteriormente sonicadas por 5 min em água deionizada para retirar as impurezas remanescentes.

### 3.5 TRATAMENTOS POR APLICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS ASSOCIADO AO DESAFIO ÁCIDO

Objetivando avaliar a capacidade de obliteração por meio dos tratamentos propostos, foram realizadas aplicações dos géis de NPs sobre a superfície dentinária durante sete dias, duas vezes ao dia com o intervalo de 8h entre cada aplicação. Após 1h de cada aplicação, o disco foi

submetido a um desafio ácido, sendo imergido em uma solução de ácido cítrico 1% por 2 minutos. Após o tempo estabelecido para o desafio ácido, o disco era lavado com água deionizada e novamente imerso na saliva artificial. Todas as aplicações foram feitas topicamente, utilizando a ponta do dedo com luva para espalhar o gel na superfície do disco em movimento na forma de “oito”, durante um minuto, como é estabelecido por alguns dentifrícios<sup>53</sup>. A Figura 9 traz um fluxograma do procedimento. Ao final dos tratamentos, análises físico-químicas e morfológicas dos discos foram realizadas para investigar o efeito na estrutura dentinária.



**Figura 9.** Etapas gerais dos tratamentos com os géis de NPs em discos inicialmente mineralizados, desmineralizados com EDTA 1% e desmineralizados com EDTA 17%.

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS SUPERFÍCIES DENTINÁRIAS

#### 3.6.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Foi utilizada a técnica de FTIR, utilizando-se acessório de reflexão atenuada (ATR) (IR Prestige-21 Shimadzu -Laboratório de Atividade Biológica e Química Supramolecular de Compostos de Coordenação-DQ-FFCLRP), buscando caracterizar quimicamente as superfícies

dentínarias e as possíveis mudanças devido aos tratamentos. Para esta análise as amostras foram secas em dessecador com vácuo por 2h e então submetidas a análise.

### 3.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície mineralizada, desmineralizada e após os tratamentos foi investigada via MEV em um microscópio Superscan SS-550 Shimadzu (DQ-FFCLRP), com aceleração de voltagem de 20 kV. Para obtenção das imagens as amostras foram recobertas com ouro e carbono pelo método de pulverização catódica (Bal-Tec, SCD-050 Sputter Coater – DQ-FFCLRP).

### 3.6.3 Espectroscopia por dispersão de raios-X

Modificações na composição química da superfície dos discos foram investigadas via EDS utilizando o microscópio eletrônico de varredura MEV JSM-6610LV da JEOL (Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica-LMME-FMRP). Foram obtidos mapas elementares e espectros dos elementos químicos contidos na superfície dentinária.

### 3.6.4 Microscopia confocal

Buscando verificar a capacidade de recobrimento superficial e avaliação da obliteração dos túbulos após tratamentos, foi feita análise em microscópio confocal (LEXT 4000, Olympus, Japão). Utilizando o software OLS 4000, foi realizada a contagem e área média dos túbulos. As contagens foram feitas nas mesmas áreas, da mesma amostra dentinária, antes e após os tratamentos com nanopartículas.

### 3.6.5 Ângulo de contato e Energia livre de superfície

A molhabilidade das amostras foi avaliada medidas de ângulos de contato, utilizando um goniômetro (OCA-20 Dataphysics - Laboratório de Físico-Química de Colóides e Superfícies -DQ-FFCLRP). Com uma câmera acoplada ao goniômetro, o equipamento capta imagens de uma gota sobre a superfície do disco dentinário, e com o software SCA-20 foi possível obter o ângulo de contato formado entre a gota e a superfície. Através da medida do ângulo médio ( $\theta$ ) entre diferentes líquidos e a superfície da dentina, e por meio da aproximação de Owens-Wendt-Kaeble foi obtido o valor da energia livre total da superfície ( $\gamma_s$ ), bem como suas constituintes polares e dispersivas<sup>57</sup>.

$$\gamma_L (1 + \cos\theta) = 2(\gamma_L^d \gamma_S^d)^{1/2} + 2(\gamma_L^p \gamma_S^p)^{1/2}$$

Na equação os sobrescritos p e d correspondem a polar e dispersiva, os subscritos L e S correspondem as superfícies sólidas e líquidas, e  $\gamma_L$  corresponde a tensão superficial dos solventes utilizados. Nesta análise foram usados três solventes com polaridades diferentes com tensão superficial, componente polar ( $\gamma^p_L$ ) e dispersiva conhecidas ( $\gamma^d_L$ ), sendo eles água deionizada, formamida (J. T. Baker, PA) e diiodometano (Sigma-Aldrich, PA).

### 3.6.6 Permeabilidade dentinária

Testes de permeabilidade dentinária foram realizadas, antes a após os tratamentos. Neste teste, foram utilizados discos de dentina padronizados, obtidos utilizando uma broca trefina longa (Wf Cirúrgicos, Maringá, Paraná). Os discos possuíam diâmetro de 4 mm, e utilizando lixa d'água de granulação 1200 (3M), os discos ficaram com 1mm de espessura. Para verificar alterações de permeabilidade dentinária foi utilizado o aparelho THD03 (Odeme Equipamentos Médicos e Odontológicos Ltda, Joaçaba, SC, Brasil). O aparelho consiste em duas câmaras, uma de pressão e outra de filtração, que são interligadas por um tubo capilar de vidro acoplado a um paquímetro digital, além de um sistema para injeção de bolha de ar no tubo capilar. Na câmara de filtração é colocado o disco de dentina, entre dois anéis de borracha para vedação, de forma que uma das faces fique exposta a pressão de 6,5 psi enquanto a outra exposta a pressão atmosférica. A água destilada, submetida a pressão no reservatório, segue todo o sistema, passando pelo capilar até a câmara de filtração, então uma pequena bolha de ar é inserida no capilar. Foi calculado então a taxa do movimento do fluido através do disco de dentina a partir do deslocamento linear da bolha de ar dentro do tubo capilar utilizando um paquímetro digital com resolução de 0,01 mm. Por meio deste valor mensurado obteve-se a taxa de filtração a partir da fórmula:

$$Q = \frac{v_p \cdot D}{L \cdot T}$$

em que  $Q$  é a taxa de filtração ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ),  $v_p$  é o volume padronizado do capilar ( $\mu\text{L}$ ),  $D$  é o deslocamento da bolha no tubo capilar (mm),  $L$  é o comprimento do capilar e  $T$  é o tempo (min) em que a bolha percorreu a distância observada no tubo capilar.

A partir da taxa de filtração foi calculado a permeabilidade dentinária que é expressa em valores de condutância hidráulica pela fórmula:

$$Lp = Q/AS(P_1 - P_2)$$



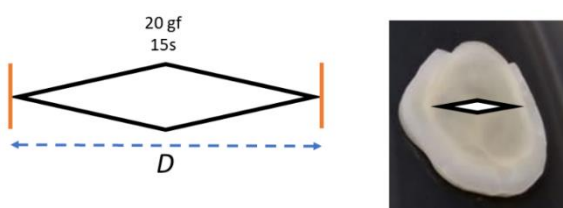
Em que  $Lp$  corresponde a condutância hidráulica expressa em  $\mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cmH}_2\text{O}^{-1}$ ,  $AS$  é a área da superfície dentinária exposta ( $\text{cm}^2$ ),  $P_1$  é a pressão hidrostática da água destilada dentro da câmara ( $\text{cmH}_2\text{O}$ ) e  $P_2$  equivale a pressão atmosférica ( $\text{cmH}_2\text{O}$ ).

### 3.6.7 Teste de microdureza

Para investigar as propriedades mecânicas foi realizado o teste de microdureza com um penetrador de diamante piramidal (Shimadzu MicroHardness Tester HMV-2000-Corporation, Kyoto, Japão). O teste consiste em endentações realizadas na superfície dos discos de dentina pelo penetrador (Figura 10), causando um recuo alongado em forma de losango e neste estudo foi utilizado o cálculo de dureza Knoop (KH) sob carga de 10 gf pelo tempo de 15s (Figura 10). Para medir as endentações, duas marcas que aparecem no visor do microdurômetro eram sobrepostas sobre os vértices do losango formado devido a endentação, dessa forma limitando o valor da maior diagonal. Obtendo este valor, o software realizou o cálculo a partir da seguinte fórmula:

$$KH = \frac{C \cdot c}{D^2}$$

Em que  $KH$  corresponde ao valor da microdureza expressa em Knoop,  $C$  é uma constante que equivale 14,230,  $c$  equivale a carga estática que neste estudo foi de 10 gf e  $D$  é o comprimento da maior diagonal da endentação<sup>58</sup>.



**Figura 10.** Figura ilustrativa do teste de microdureza feito sobre a superfície do disco de dentina mostrando o losango formado pela endentação do penetrador de diamante piramidal.

## 3.7 APLICAÇÃO EM CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE POLPA DENTÁRIA HUMANA

### 3.7.1 Ensaio de viabilidade celular

Foram cultivadas hDPSCs em meio de crescimento  $\alpha$ -MEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% (v/v) de estreptomicina/penicilina e incubadas em atmosfera

umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foram utilizadas células de três doadores, as quais foram caracterizadas quanto a presença de células tronco por citometria de fluxo empregando o painel de marcadores da associação internacional. O teste de viabilidade na presença das NPs de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp foi investigado pelo teste clássico de MTT nos períodos de 24h e 48h, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL. Para o ensaio MTT as células foram tripsinizadas, ressuspendidas em DMEM e plaqueadas em placa de 24 poços com uma densidade de 2x10<sup>4</sup> células por poço. Após as células aderirem na superfície foi realizado o tratamento com as NPs. A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem da média de três experimentos em relação ao controle, células cultivadas na ausência de NPs<sup>59,60</sup>.

### 3.7.2 Atividade da fosfatase alcalina (TNAP)

A atividade da fosfatase alcalina (TNAP) foi determinada pela reação do pNPP (p-nitrofenil fosfato, Sigma). O meio de reação foi composto de pNPP 10 mM e MgCl<sub>2</sub> 1mM em tampão AMPOL (2-amino-2-metil-1-propanol), de pH 10,3. A reação à 37°C foi iniciada com a adição de 90 µL da suspensão de enzima extraída das células cultivadas com as nanopartículas durante 7 e 14 dias (2 × 10<sup>4</sup> células/poço na placa de 24 poços). A extração de enzima foi feita com a remoção do meio de cultura, então as células foram tripisinizadas. Após remoção da tripsina, o pallet foi ressuspendido em tampão de choque osmótico e posteriormente centrifugado a 44000rpm por 60 minutos a 4°C. Posteriormente foi retirado o sobrenadante e ressuspendido em tampão estoque para posterior homogeneização da suspensão contendo a enzima. Após o tempo de reação de 2 horas, foram realizadas leituras de absorbâncias a 405 nm utilizando um espectrofotômetro UV/Visível (Thermo Scientific™ Evolution™ 60S). Após determinação da dosagem de proteína pelo método de Hartree, e a atividade expressa em Umg<sup>-1</sup> de proteína<sup>61</sup>.

### 3.7.3 Formação de nódulos mineralizados

A formação de nódulos mineralizados foi verificada após 14 dias de tratamento com as nanopartículas na concentração de 1µg/mL na cultura de células e quantificada pela metodologia de coloração com vermelho de alizarina. Os poços que contendo as células foram lavados com PBS com o propósito de remover qualquer partícula não-específica de fosfato que tenha sido precipitada. Sequencialmente, os nódulos foram fixados com formalina (10%) a 37°C por 24 horas, sendo então desidratados por etanol e secos. Foi então feita a coloração do conteúdo dos poços por meio da dissolução com vermelho de alizarina (2%) em ácido acético e neutralizado com hidróxido de amônio. Por meio de um espectrofotômetro Spectronic

(Genesys 2) a absorbância foi registrada a 405 nm, depois da dissolução dos nódulos com cloreto de cetilpiridíneo<sup>62</sup>.

### 3.7.4 Expressão de RNA mensageiro por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

As células foram incubadas com as nanopartículas contendo 0%, 10%, 50% e 100% de incorporação de Sr<sup>2+</sup>, na concentração de 1µg/mL, durante 7 e 14 dias. Para extração do RNA, foi utilizado o Kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total empregando o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). A expressão gênica (n = 3) foi analisada em equipamento StepOne (Applied Biosystems) usando TaqMan PCR Master Mix, e sondas (Applied Biosystems) para os genes alvo: colágeno tipo 1 alfa 1 – COL1A1 (Hs00164004\_m1), fosfatase alcalina - ALP (Hs01029144\_ml), runt-related transcription factor 2 - RUNX2 (Hs01047973\_ml) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - GAPDH (Hs02758991\_gl). Os transcritos foram normalizados para GAPDH e os dados foram mostrados como expressão relativa de mRNA usando o método do *cycle threshold* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )<sup>63</sup>.

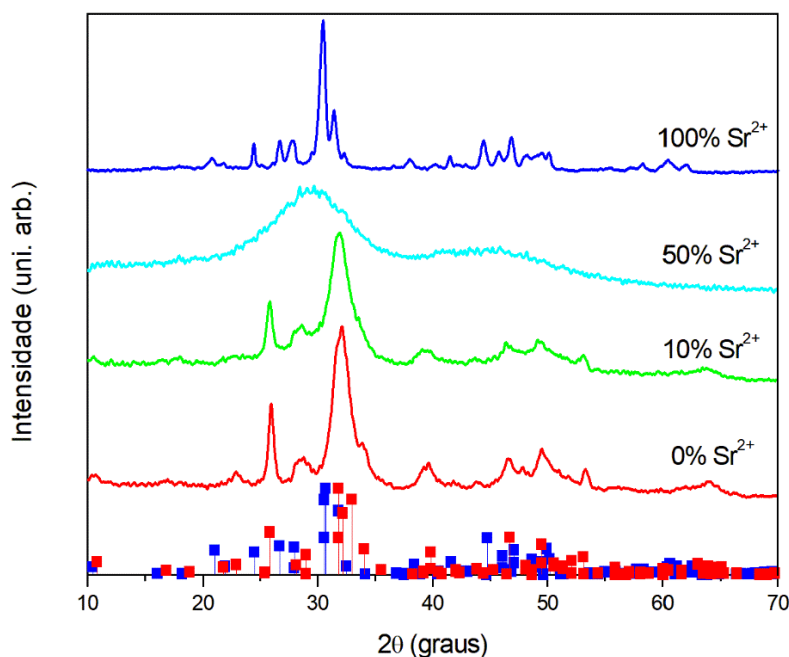
### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística utilizando análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativamente diferentes em  $p < 0.05$ . Para a análise de células os resultados foram descritos como média  $\pm$  desvio padrão da média de valores obtidos, pelo menos, de triplicata. Os dados das análises de citotoxicidade, atividade da fosfatase alcalina e expressão gênica dos marcadores relacionados à osteogênese foram comparados por ANOVA de duas vias, seguida do teste de Tukey. Os dados de formação de nódulos mineralizados foram comparados por ANOVA de uma via e teste de Tukey. Foi empregado o programa estatístico GraphPadPrism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), com nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE HAp SUBSTITUÍDAS POR Sr<sup>2+</sup>

A série de difratogramas a seguir referem-se as NPs de HAp sintetizadas de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp, que são relativas as variações nas porcentagens molares de Sr<sup>2+</sup> de 0, 10, 50 e 100% com relação a Ca<sup>2+</sup>, sem tratamento térmico. O difratograma da amostra de 0%SrHAp contém picos bem definidos e condizentes ao padrão referente a estrutura hexagonal característico da hidroxiapatita pura, grupo espacial P6<sub>3</sub>/m (COD 9002214), indicando que o processo de síntese utilizado resultou em cristais de hidroxiapatita estequiométrica Ca/P = 1,67. Nota-se que, a partir da incorporação do Sr<sup>2+</sup>, os difratogramas indicam variações na posição das reflexões de Bragg para todas as porcentagens incorporadas (figura 11).



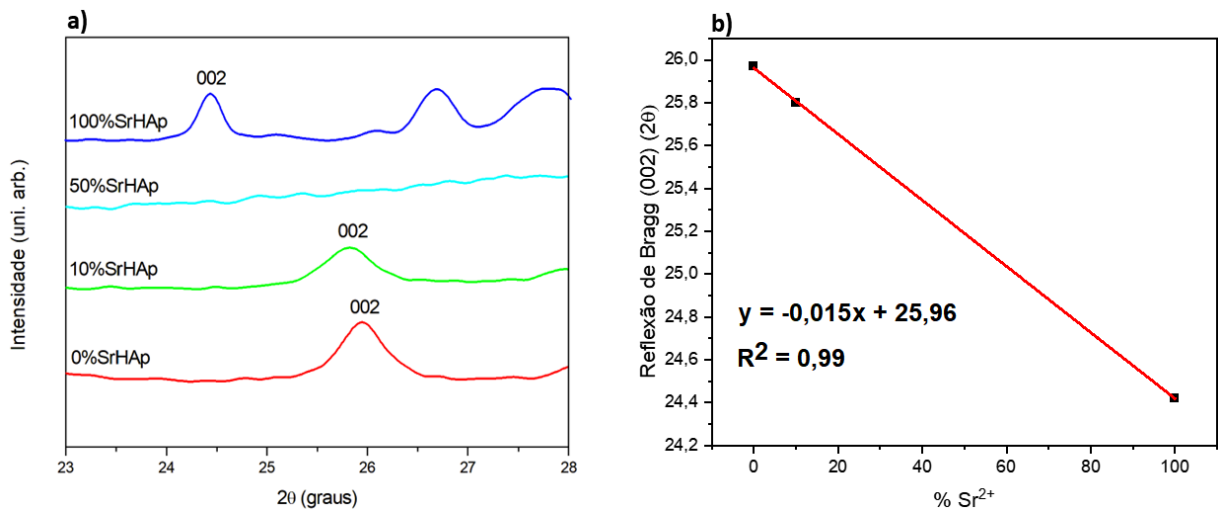
**Figura 11.** Difratogramas das NPs de HAp sintetizadas de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp, sem tratamento térmico. Padrão (■) referente a HAp (COD 9002214) e padrão (■) referente a estrôncio apatita (COD 9011132).

Para as NPs de 0%SrHAp, as reflexões de Bragg foram similares à HAp pura com picos também bem definidos. Entretanto há um leve deslocamento para menores valores de 2θ do

pico referente ao plano 002, na posição aproximada de  $26^\circ$  (Figura 11), além de um visível alargamento dos picos da região de  $28^\circ$  a  $40^\circ$  para NPs sem tratamento, sendo esta última característica um indício da diminuição do tamanho da partícula<sup>64</sup>.

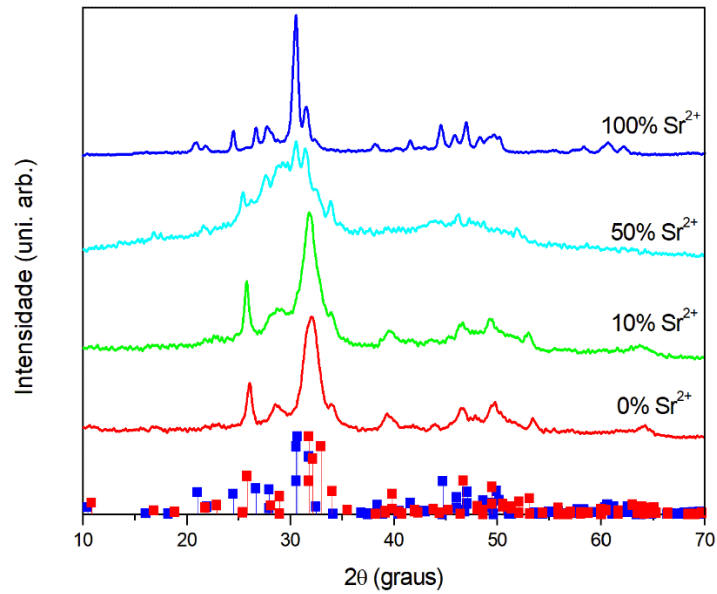
As NPs de 50%SrHAp sem tratamento térmico não possuem picos definidos referente a reflexões de Bragg em seu difratograma, indicando ser um material amorfo. O aumento da quantidade de  $\text{Sr}^{2+}$  dificulta a acomodação deste íon, de maior raio em comparação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , gerando grande distorção na rede cristalina o que justifica a desordem estrutural e perfil amorfo destas NPs<sup>64,65</sup>. O difratograma das NPs de 100%SrHAp possui picos bem definidos e característicos ao padrão da estrutura cristalina hexagonal (grupo espacial P63/m) referente à estrôncio apatita (COD 9011132). Os picos mais intensos e menos largos são indicativos de maior tamanho dos cristais, e perfil mais cristalino que a estrôncio apatita possui, uma vez que o Sr contém mais elétrons que o Ca, é esperado que espalhe mais efetivamente os raios-x, portanto, os picos mais intensos e maior cristalinidade em comparação a HAp<sup>64,66</sup>.

Todas essas variações nos difratogramas dos diferentes tipos de NPs sintetizadas são indícios da efetividade da incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$  neste método de síntese, que conseqüentemente, promoveu alterações estruturais causadas pela presença deste íon na estrutura cristalina da HAp. Ao considerar essas modificações estruturais conforme a porcentagem molar de  $\text{Sr}^{2+}$  aumenta na estrutura das NPs, é possível notar a mudança de fase da HAp pura para estrôncio apatita, a partir de uma transição gradual por meio de fases intermediárias, dentre elas, fases completamente amorfas (50%  $\text{Sr}^{2+}$ ). Alteração dos parâmetros de rede da célula unitária da HAp, ocasionados pela inserção do estrôncio, pode ser verificado pelo deslocamento da reflexão de Bragg (002) (Figura 12.a), referente a distância interplanar relativo ao parâmetro c da célula unitária. Conforme a porcentagem de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado aumenta, nota-se a tendência de um deslocamento linear da reflexão de Bragg neste pico, condizente a introdução de um íon com maior raio que conseqüentemente causa maior distanciamento interplanar<sup>64,65</sup>. (Figura 12.b).

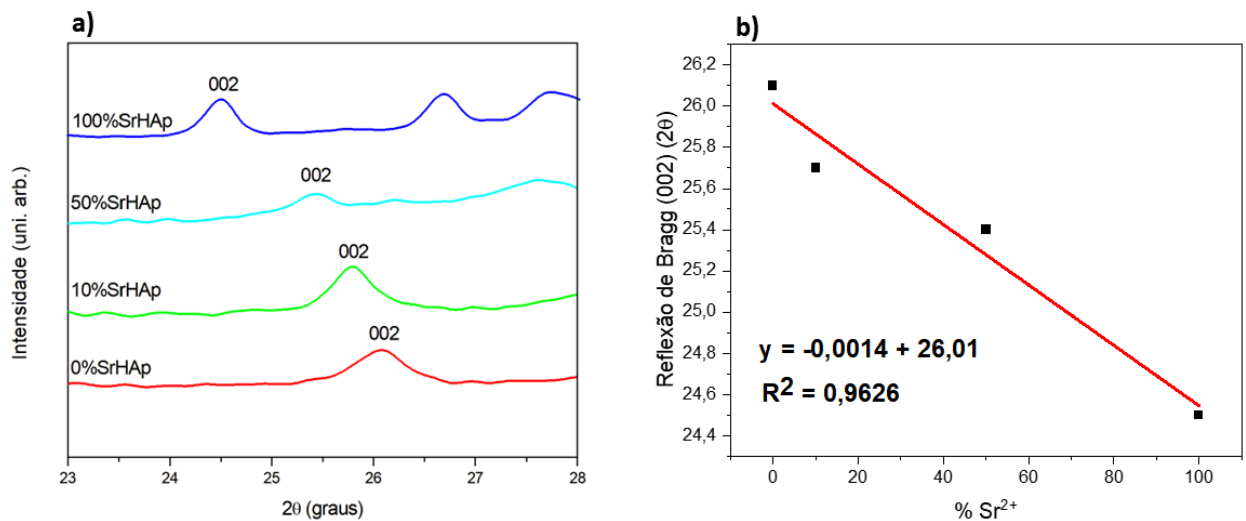


**Figura 12.** Efeitos ocasionados devido a incorporação de íons  $\text{Sr}^{2+}$  nas partículas de HAp sem tratamento térmico. **(a)** Variação da posição dos picos referentes ao plano 002 nos difratogramas das nanopartículas 0% SrHAp, 10% SrHAp, 50% SrHAp e 100% SrHAp. **(b)** Deslocamento linear da reflexão de Bragg (002) conforme o aumento da incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$ , indicando um aumento da distância interplanar.

Após o tratamento térmico ao qual as NPs foram submetidas, as reflexões de Bragg mostraram padrões semelhante as NPs antes do tratamento térmico (Figura 13). Nota-se a permanência do perfil mais cristalino para as NPs contendo 100% de substituição de  $\text{Sr}^{2+}$  e difrações de Bragg característica da estrutura de estrôncio apatita. Os picos obtidos no difratograma para as NPs de 0% SrHAp e 10% SrHAp são semelhantes aos da HAp pura, com o desvio de picos relativos ao aumento da distância interplanar. As NPs de 50% SrHAp permaneceram com perfil amorfo, entretanto nota-se o surgimento de picos indicando possível segregação de fase cristalina e amorfa, porém com estrutura majoritariamente amorfa. Com o aparecimento de alguns picos no difratograma das NPs de 50% SrHAp, tornou-se mais evidente a tendência linear do aumento da distância interplanar com a inserção do  $\text{Sr}^{2+}$  na estrutura cristalina da HAp (Figura 14).



**Figura 13.** Difratogramas das nanopartículas de HAp sintetizadas com variações de porcentagem de  $\text{Sr}^{2+}$  (0%, 10%, 50% e 100%) com tratamento térmico. Padrão (■) referente a HAp (COD 9002214) e padrão (■) referente a estrôncio apatita (COD 9011132).



**Figura 14.** Efeitos ocasionados devido a incorporação de íons  $\text{Sr}^{2+}$  nas partículas de HAp após tratamento térmico. **(a)** Variação da posição dos picos referentes ao plano 002 nos difratogramas das NPs de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp. **(b)** Deslocamento linear da reflexão de Bragg (002) conforme o aumento da incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$ , indicando um aumento da distância interplanar.

A partir dos difratogramas das NPs foi possível realizar o cálculo de tamanho de cristalito a partir da equação de Scherrer. Com esse propósito foi utilizada a reflexão de Bragg na região de aproximadamente  $26^\circ$  (002), identificando a largura a meia altura (FWHM) deste pico a partir de uma função pseudo-Voigt, obtendo, portanto, o tamanho do cristalito (Tabela 3).

Nota-se que para as NPs sem tratamento térmico, a incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$  com 10% causou diminuição do tamanho do cristalito, o que é justificado devido ao desordenamento estrutural provocado. Com a total incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$  ocorreu um aumento do cristalito justificado pela maior distância interplanar. Após o tratamento térmico, o tamanho de cristalito calculado para a amostra 10%SrHAp foi maior que o da de 0%SrHAp, oposto do observado para a amostra não tratada. Esse fato pode ser justificado pelo tratamento térmico ser capaz de acomodar os íons incorporados tornando a rede cristalina mais organizada e, portanto, para as amostras tratadas termicamente, um aumento do tamanho de cristalito proporcional ao aumento de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado.

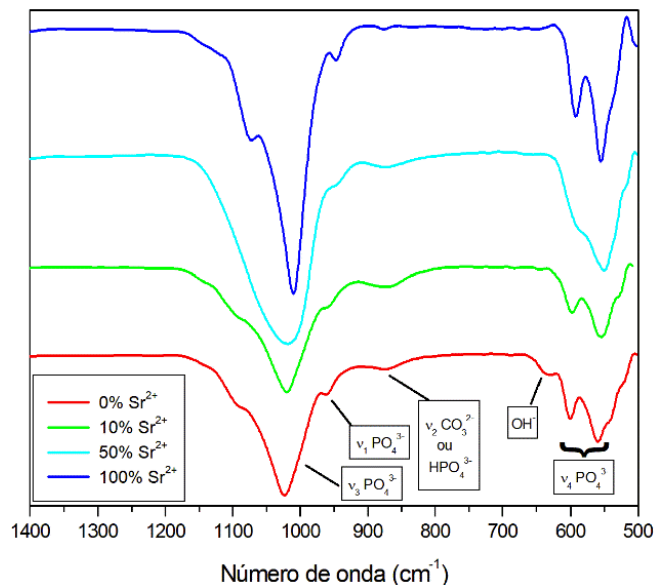
**Tabela 3.** Tamanho dos cristalitos referentes as NPs de  $\text{Sr}^{2+}$  de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp, antes e após o tratamento térmico

NPs	Tamanho de cristalitos (nm)	
	Sem tratamento	Após tratamento
0%SrHAp	15,57	13,70
10%SrHAp	12,60	17,00
50%SrHAp	*	*
100%SrHAp	36,40	24,50

\*Não calculado: partícula amorfa

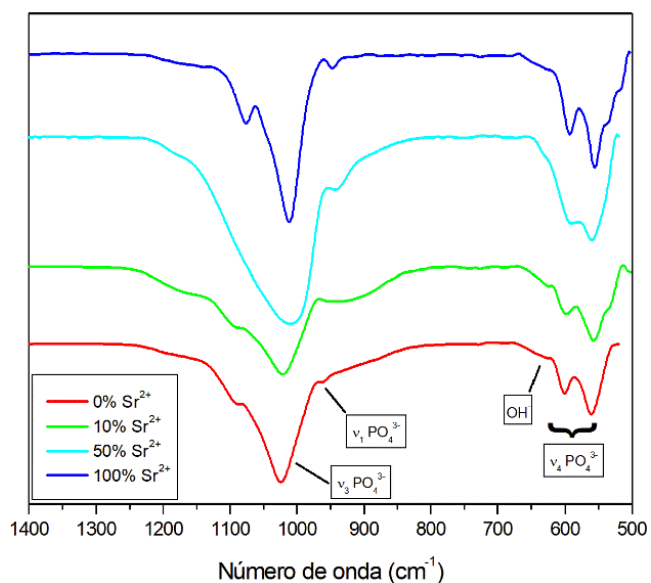
Buscando complementar a caracterização química, foram investigados espectros de infravermelho das NPs antes e após o processo de tratamento térmico. Os espectros apresentados na figura 15 foram obtidos para amostras sem tratamento térmico. No espectro referente a 0%SrHAp é possível notar as bandas características na região de  $1400\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  relacionadas aos modos vibracionais do grupo fosfato. São esses:  $\nu_1$  em  $960\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_3$  em  $1036\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_4$  em  $565$  e  $606\text{ cm}^{-1}$ <sup>58</sup>. Verifica-se ainda presença da banda relativa ao modo vibracional  $\nu_2$  do  $\text{CO}_3^{2-}$  em  $872\text{ cm}^{-1}$  e a banda relativa ao estiramento do grupo OH em  $633\text{ cm}^{-1}$ <sup>59</sup>.





**Figura 15.** Espectros FTIR das NPs 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp antes do tratamento térmico. Nos espectros estão indicadas as bandas de absorção típicas.

Nota-se que nos espectros das amostras 10%SrHAp e 50%SrHAp há perda da degenerescência dos modos  $\nu_3$  e  $\nu_4$ , evidenciada pelo alargamento das bandas, além da diminuição de intensidade da banda relacionada ao modo  $\nu_1$ , corroborando os resultados de difratometria que mostraram que a incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$  desestabiliza a rede cristalina até a formação de fase amorfa<sup>68</sup>. Com substituição total de estrôncio, a resolução das bandas melhora, constatando juntamente com o difratograma, a formação de estrôncio apatita com estrutura cristalina bem definida<sup>66</sup>.



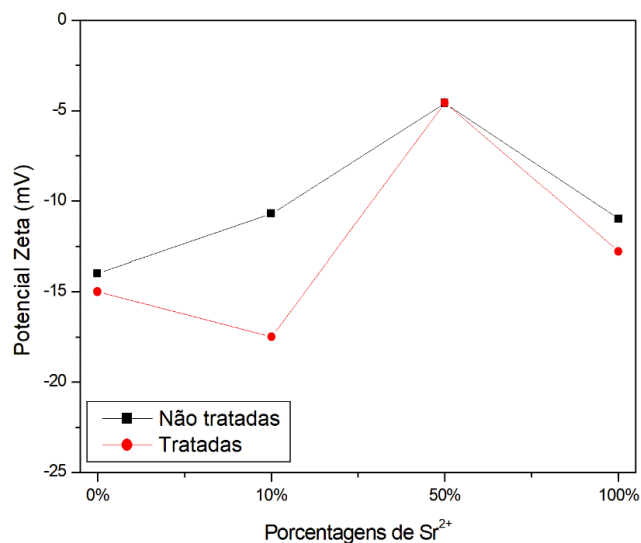
**Figura 16.** Espectros no infravermelho das NPs de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp após o tratamento térmico. Nos espectros estão indicadas as bandas de absorção típicas.

Observando os espectros das amostras após o tratamento térmico (Figura 16), é perceptível que banda de  $\text{CO}_3^{2-}$  se tornou ausente, confirmando uma diminuição considerável deste ânion na estrutura das NPs de HAp. Esta condição ocorreu devido ao tratamento térmico uma vez que temperaturas até  $600^\circ\text{C}$  este íon é eliminado, tornando a nanopartícula menos carbonatada<sup>69</sup>. Considerando o estiramento referente ao grupo OH, é notório sua diminuição com a adição de estrôncio. Já foi verificado em estudos anteriores que a introdução de um cátion maior interfere diretamente no ambiente químico do grupo OH<sup>67</sup>. Com o aumento da quantidade de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado, este tende a se alocar nos sítios de CaII favorecendo uma diminuição da densidade espacial das ligações OH influenciando assim o desaparecimento da banda conforme a quantidade de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado aumenta<sup>70</sup>.

Ao verificar modificações estruturais entre as variedades de NPs, buscou-se analisar variações na carga de superfície a partir de medidas de potencial zeta. O valor do potencial está diretamente ligado à estabilidade das partículas em uma suspensão. Valores acima de  $\pm 30$  mV indicam partículas com elevada estabilidade coloidal devido à repulsão entre as em meio líquido, prevenindo agregação<sup>71</sup>.

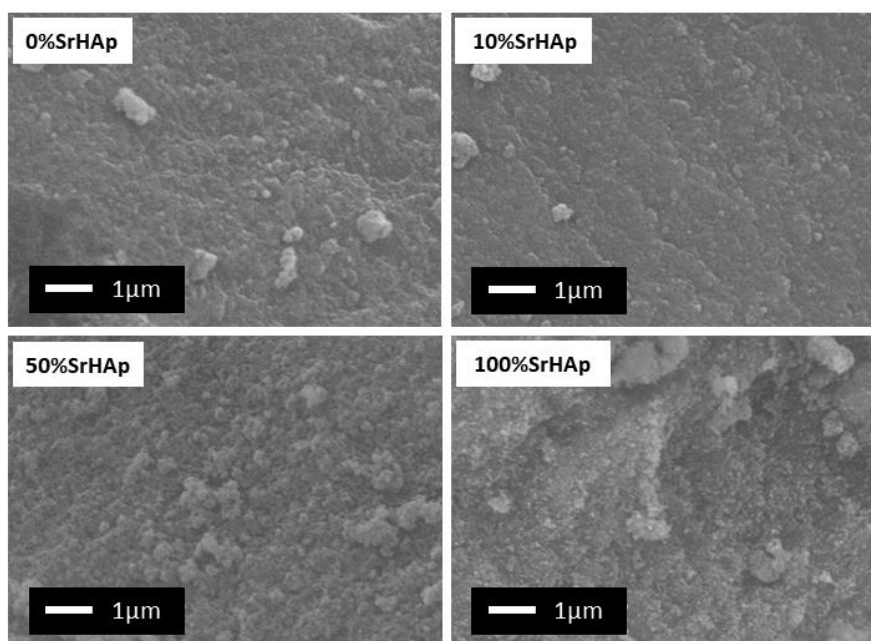
Os valores de carga de superfície das NPs suspensas em água foram negativos independentemente da quantidade de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporada (figura 16). Alguns estudos na literatura reportam valores negativos para NPs de HAp sintética que variam de -11,5 mV a -21,2 mV. As variações nos valores reportados na literatura são justificadas pelas diferentes metodologias de síntese e tratamentos posteriores a formação dos cristais<sup>72,73,74</sup>. Portanto, considerando a interferência na estrutura cristalina da HAp com as diferentes concentrações de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado é notório sua interferência nos valores de potencial zeta devido a modificação estrutural proporcionada.

Valores negativos de potencial zeta tem-se mostrado favoráveis para fixação e proliferação de células ósseas. Cheng et. al. investigaram a influência de revestimentos de hidroxiapatita fluoretada no comportamento de osteoblastos, concluindo que as células aderiam e proliferavam nos revestimentos e que a taxa de proliferação era intensificada quanto mais negativo fosse o potencial zeta do revestimento<sup>75</sup>. Smeets et. al verificaram o potencial osteogênico de um composto de cálcio bifásico com carga de superfície negativa para o aumento do assoalho do seio maxilar, que se mostrou favorável na osseointegração e regeneração óssea de implantes dentários<sup>76</sup>.

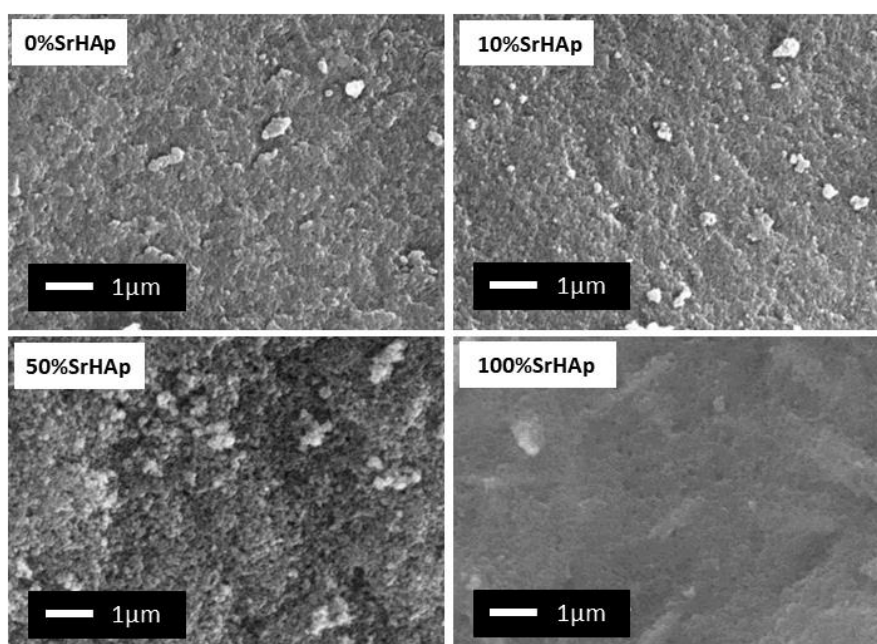


**Figura 16.** Valores obtidos das cargas superficiais das nanopartículas antes do tratamento térmico (preto) e após o tratamento térmico (vermelho). O valor da carga de superfície variou de acordo com a incorporação de Sr<sup>2+</sup>.

Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, mostram a formação e partículas para todas as porcentagens de Sr<sup>2+</sup> incorporadas independente do tratamento térmico, não mostrando diferenças morfológicas, ao menos na resolução desta técnica. Esta mesma tendência foi observada tanto para as NPs não tratadas termicamente quanto para as submetidas ao tratamento térmico (Figura 17 e 18).



**Figura 17.** Imagens de MEV das NPs de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp antes do tratamento térmico.

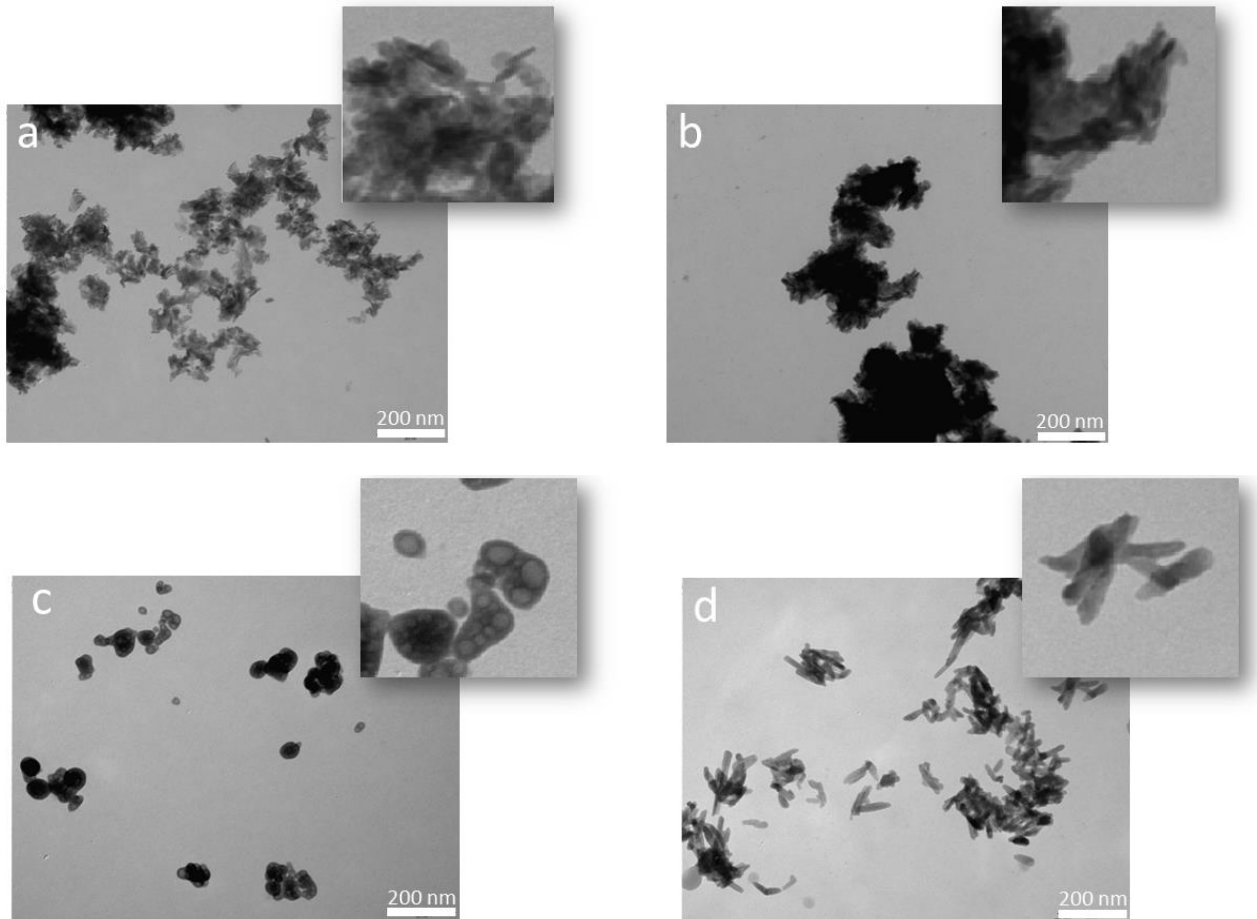


**Figura 18.** Imagens de MEV das NPs de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp após o tratamento térmico.

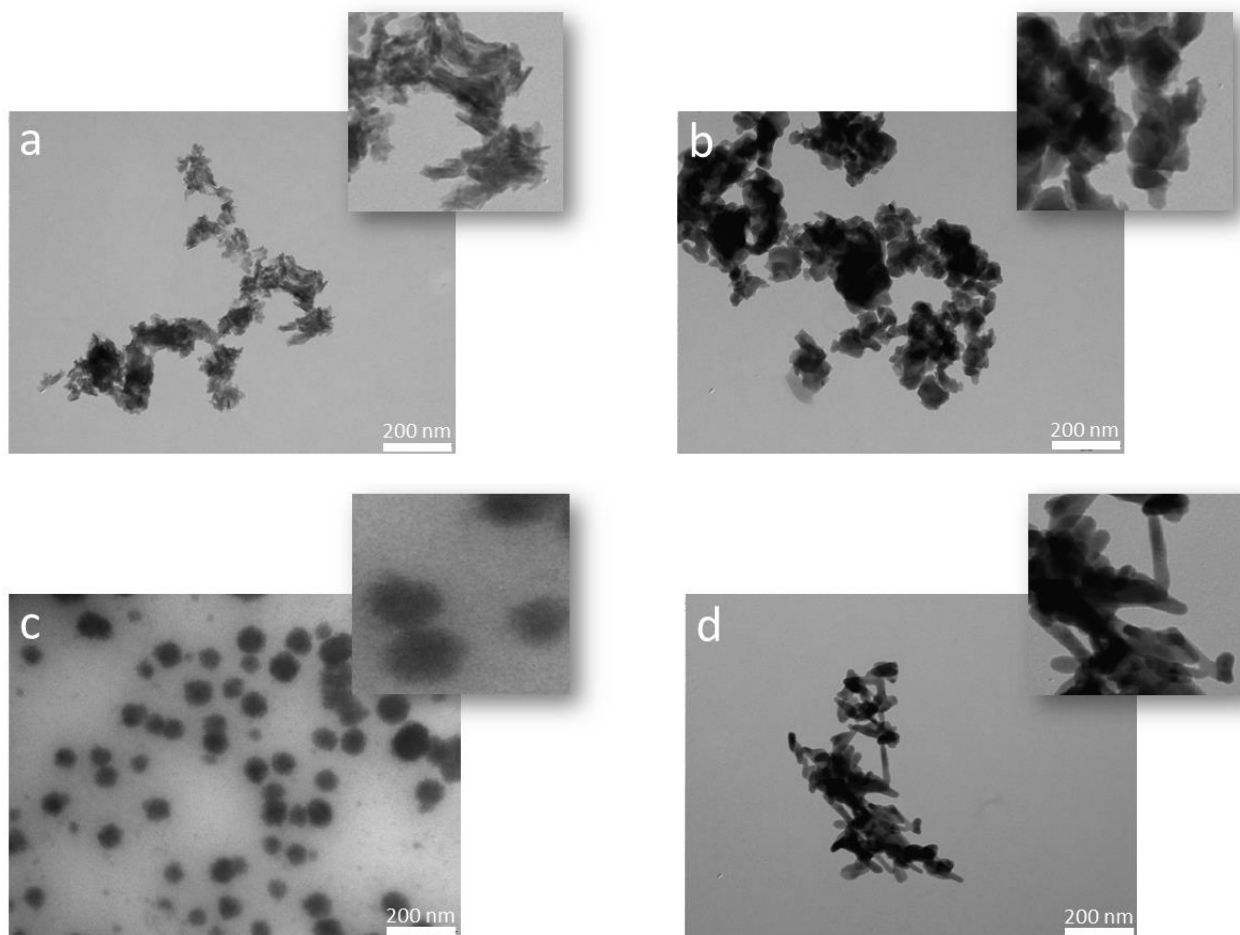
Imagens de MET foram obtidas buscando investigar possíveis diferenças de morfologia devido a incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$ . As figuras 19 e 20 mostram imagens antes e após o tratamento térmico para as NPs de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp. As NPs de 0%SrHAp mostram forma de agulha e forma de placas, ambas características dessas nanoestruturas e obtidas por métodos de co-precipitação<sup>65,66</sup> e com dimensões bem abaixo de 100 nm, confirmando a natureza de ordem nanométrica destas estruturas. As imagens de 10%SrHAp, antes e após o tratamento térmico mostram formas e bordas menos definidas, diferentes do padrão de agulha<sup>66</sup>, sendo este o indício de deformação da estrutura cristalina devido a entrada de  $\text{Sr}^{2+}$  como verificado nos difratogramas.

Para as NPs de 50%SrHAp são verificadas estruturas completamente disformes e com padrão muito diferente do esperado para a estrutura de HAp estequiométrica. Este perfil amorfo é proveniente da desestabilização da estrutura cristalina. As NPs de 100%SrHAp mostram aumento das dimensões dos cristais, uma forma bem mais definida e alongada do perfil de agulha da HAp, sendo este alongamento em direção paralela ao eixo  $c$ <sup>66</sup>. Desta forma, as imagens de TEM indicam natureza nanométrica dos cristais obtidos, bem como as variações morfológicas que ocorrem com o aumento gradual de incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$  e seus efeitos na estrutura cristalina da HAp estequiométrica. A mudança nas dimensões do cristal reforça a incorporação do  $\text{Sr}^{2+}$  e como a presença de um íon maior, em comparação ao cálcio, promove

variações estruturais e corroboram a análise de cristalinidade obtida por DRX, bem como as mudanças de potencial zeta devido a formas estruturais diferentes.



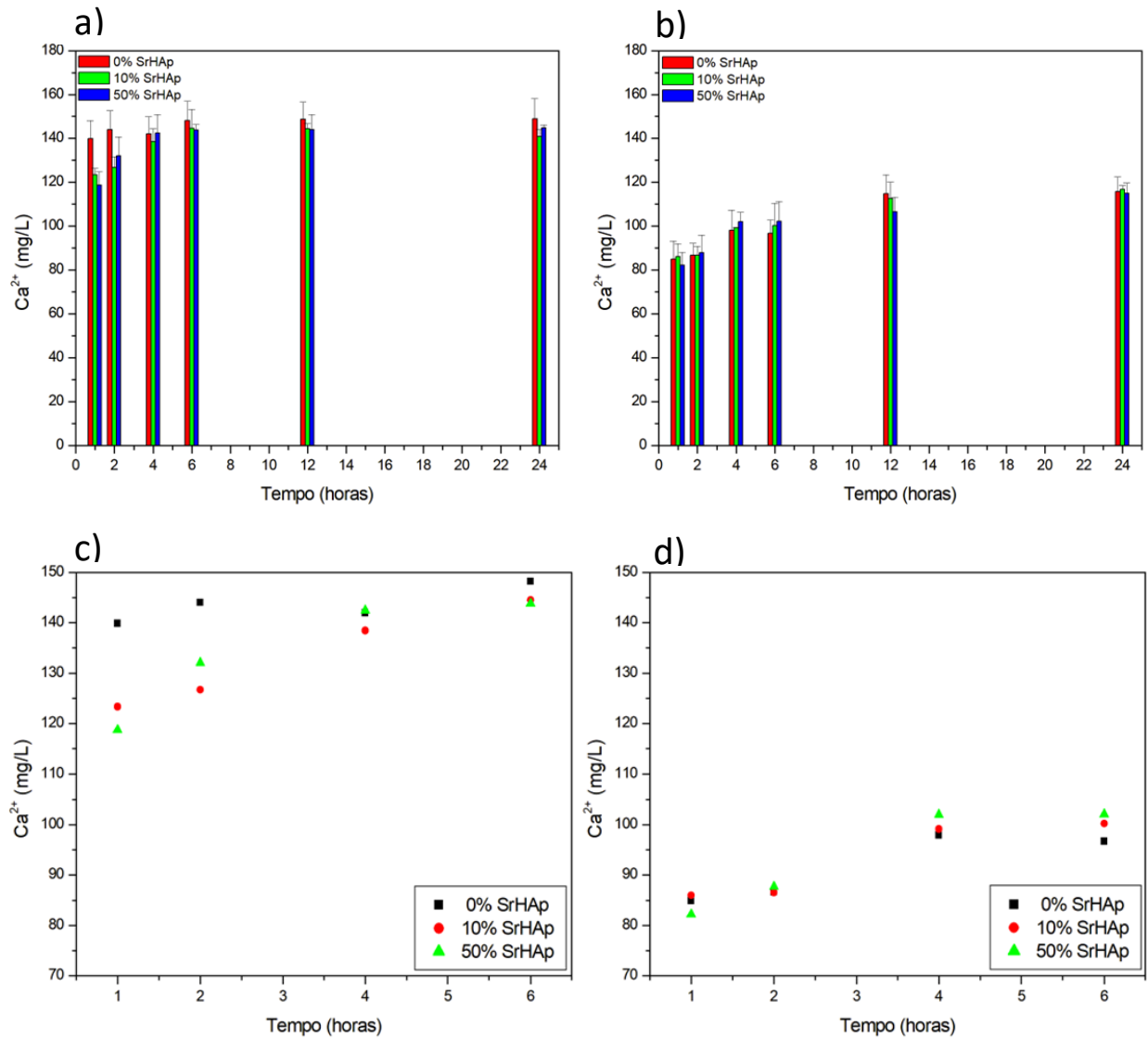
**Figura 19.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de (a) 0% SrHAp, (b) 10% SrHAp, (c) 50% SrHAp, (d) 100% SrHAp, antes do tratamento térmico.



**Figura 20.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de (a) 0%SrHAp, (b) 10%SrHAp, (c) 50%SrHAp, (d) 100%SrHAp, após o tratamento térmico.

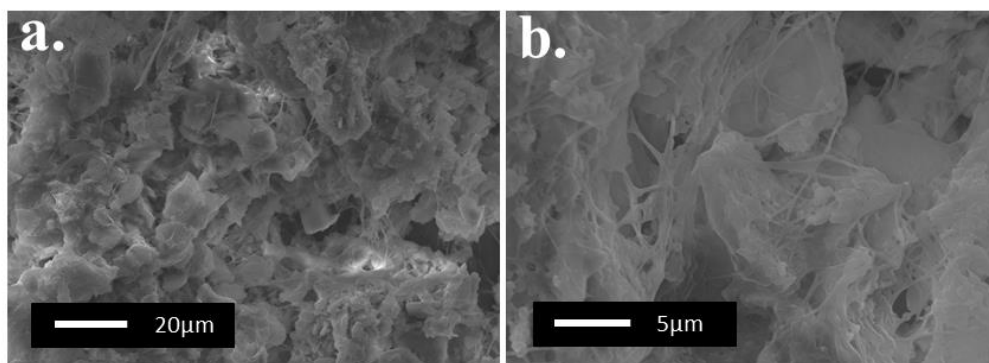
A liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  das NPs foi avaliada em água utilizando-se eletrodo seletivo (Figura 21). Considerando a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  após 24h, as NPs sem tratamento alcançaram maiores valores em comparação as NPs tratadas termicamente (Figura 21.a e Figura 21.b). Esse maior índice de liberação indica estar relacionada a presença de carbonato nas estruturas que torna os cristais mais solúveis, bem como e menor ordenamento cristalino quando comparada as NPs submetidas ao tratamento térmico<sup>77</sup>. Para as NPs com tratamento térmico, nota-se que houve similaridade nos valores de  $\text{Ca}^{2+}$  liberados, desde as primeiras horas, indicando que a liberação deste íon não é dose-dependente, sendo esta característica comum a todos os grupos de NPs tratados termicamente. Este efeito está relacionado ao aumento da solubilidade da NPs com  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado, refletindo na cinética de liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>45,78,79</sup>. Essa característica de aumento de solubilidade com a presença de  $\text{Sr}^{2+}$  tem relação ao efeito desestabilizador causado na estrutura cristalina da hidroxiapatita<sup>79,80</sup>. Buscando a aplicação das NPs para um tratamento remineralizante, a possibilidade de maior liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  mostra-se como

uma característica relevante. A partir deste ponto, foi escolhido para o desenvolvimento dos testes remineralizantes as NPs não-tratadas termicamente, mostrando maior adequação aos objetivos propostos.



**Figura 21.** (a) Perfil de liberação de  $Ca^{2+}$  das amostras sem tratamento térmico no intervalo de 24 horas. (b) Liberação de  $Ca^{2+}$  das amostras com tratamento térmico no intervalo de 24 horas. (c) Liberação de  $Ca^{2+}$  das amostras sem tratamento térmico no intervalo de 6 horas. (d) Liberação de  $Ca^{2+}$  das amostras com tratamento térmico no intervalo de 6 horas.

A formação de um gel de NPs pela adição de COL1 foi proposta como uma forma de auxiliar na fixação e no carregamento das NPs no interior dos túbulos dentinários. A morfologia das NPs após incorporação no COL1 foi verificada por MEV (Figura 22). Nota-se que o processo de formação do gel resultou em agregados de cristais de HAp recobertos por fibrilas de COL1. O processo de mistura entre os dois materiais não danificou a estrutura fibrilar característica do COL1 e permitiu a formação de um biocompósito de NPs e COL1, formando um gel com os dois principais componentes inorgânico e orgânico da matriz óssea.



**Figura 22.** Imagens de MEV de agregados de nanopartículas de 0% SrHAp recobertas pelas fibrilas de COL1 em diferentes ampliações. Em ambas se nota muitas fibrilas indicando que o processo não danificou sua estrutura.

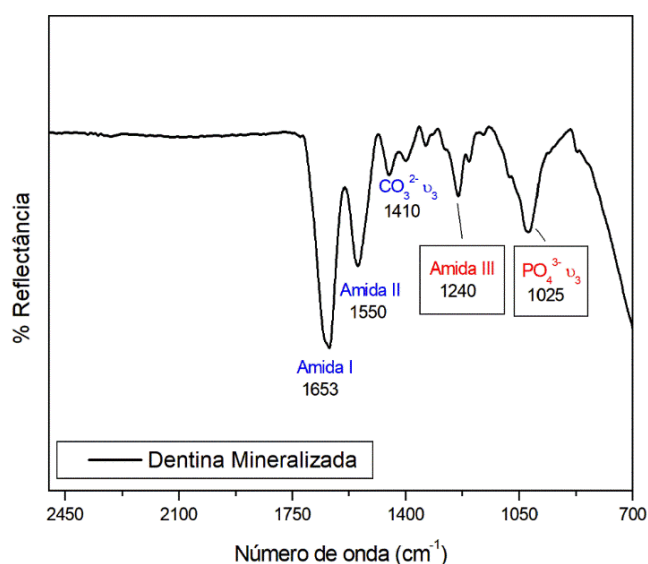
A relação entre fibrilas de colágeno e fosfatos de cálcio (CaP) ocorre naturalmente no processo de mineralização biológica, com a infiltração de nanopartículas de CaP e precipitação de apatita no interior da matriz colágena. Os domínios positivos das fibras e fibrilas de COL1 conseguem acomodar os agregados de NPs de carga negativa. Esses CaP têm como característica o tamanho nanométrico, carga de superfície negativa<sup>81</sup>.



## 4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS DENTINÁRIOS MINERALIZADOS E DESMINERALIZADOS

Buscando verificar a possibilidade de obliteração e remineralização do tecido dentinário a partir das NPs carregadas por COL1, amostras de dentina foram obtidas conforme descrito na parte experimental e desmineralizadas. O tecido dentinário desmineralizado é característico de uma dentina exposta a variações de pH, e com exposição e alargamento dos túbulos dentinários<sup>31</sup>. Foram investigados alguns níveis de desmineralização, de mais brandos à mais intensos, e suas características morfológicas e químicas comparadas à dentina sadia.

A técnica de ATR-FTIR possibilitou verificar modificações químicas no tecido dentinário pela identificação de água, fosfato, carbonato e colágeno, uma vez que estes componentes absorvem fortemente a região do infravermelho, e são os principais constituintes da dentina<sup>82</sup>. Estudos de caracterização e modificação da superfície dentinária por ATR-FTIR<sup>83-86</sup> verificaram entre a região de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  a presença e variações de bandas intensas dos modos vibracionais referentes ao COL1 e demais proteínas não colágenas, ou seja, os componentes orgânicos deste tecido mineralizado, além da presença de bandas relativas aos modos vibracionais do fosfato, confirmando a presença de apatita biológica. O espectro obtido para a dentina mineralizada está mostrado na Figura 23.



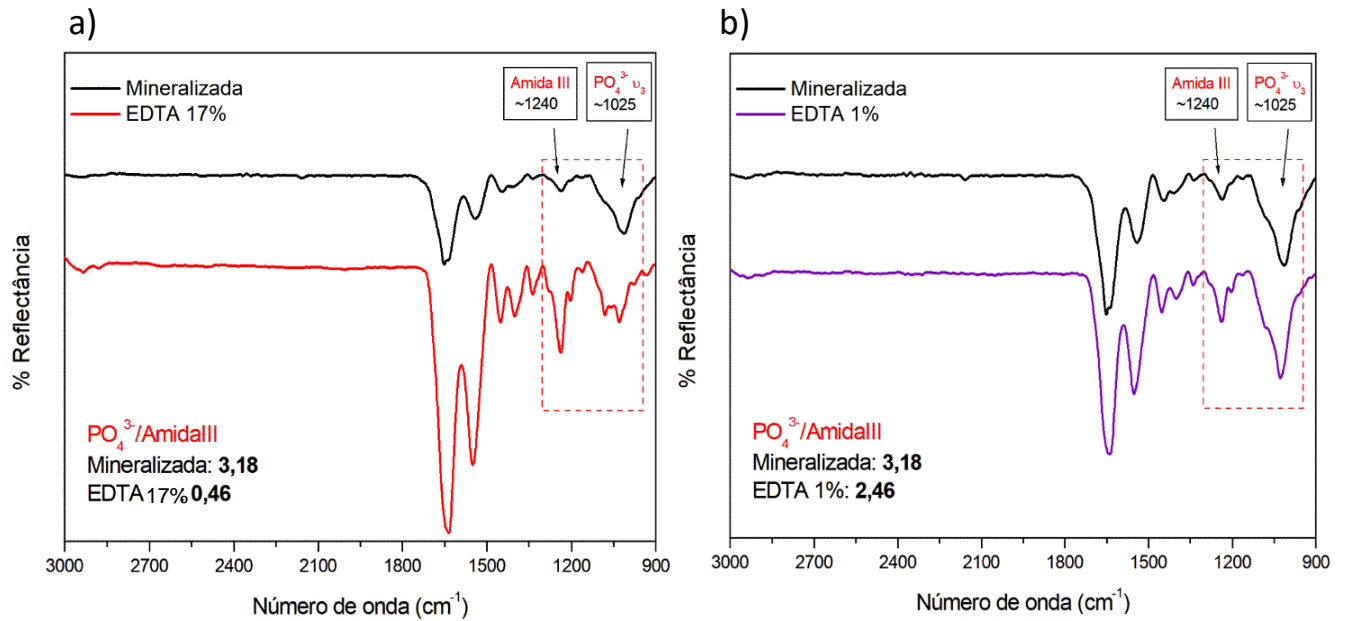
**Figura 23:** Espectro FTIR da superfície do disco de dentina mineralizado. As bandas de amida representam a fase orgânica, enquanto as bandas de fosfato e carbonato a composição inorgânica deste biocompósito.

Nota-se no espectro obtido a partir do disco de dentina mineralizada (figura 23) as bandas de amida I, II e III nas posições  $1653\text{ cm}^{-1}$ ,  $1550\text{ cm}^{-1}$ ,  $1240\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. A banda de fosfato relativa ao modo vibracional  $\nu_3$  está localizado na região de  $1025\text{ cm}^{-1}$ , e a banda do carbonato relativa ao modo vibracional  $\nu_3$  encontra-se na região  $1410\text{ cm}^{-1}$ , estes como representantes da fase inorgânica<sup>82</sup>. O COL1 é o maior constituinte orgânico nas regiões intertubulares do tecido dentinário, e é possível identificar sua presença e integridade a partir da banda amida III<sup>87</sup>, uma vez que esta denota a integridade da tripla hélice, característica da estrutura do tropocolágeno. A partir deste espectro característico da superfície dentinária é possível acompanhar diferenças entre os tratamentos.<sup>52,82</sup>.

Sabendo-se que característica fundamental da hipersensibilidade dentinária é a exposição dos túbulos dentinários ao ambiente oral e conseqüentemente o aumento do diâmetro destes túbulos proporcionando maior movimentação do fluxo do fluido tissular<sup>7</sup>, com o intuito de simular o tecido dentinário sob as condições de hipersensibilidade, foi utilizado o EDTA como agente desmineralizante. Em protocolos endodônticos sua utilização já é conhecida, sob concentrações e tempos diversos, devido a capacidade de sequestrar o cálcio da matriz inorgânica, retirando a *smear layer* e alargando os túbulos dentinários<sup>48</sup>. O processo de desmineralização consiste na retirada da matriz inorgânica, ou seja, dos cristais de apatita, tanto da superfície da dentina quanto no interior dos túbulos dentinários, provocando variações na composição química e ordenamento da estrutura altamente hierarquizada característica deste biocompósito<sup>88</sup>. Objetivando investigar o resultado da aplicação das diferentes NPs carregadas por COL1 sob substratos em diferentes graus de desmineralização, foi utilizado EDTA nas concentrações de 1% e 17%, para mimetizar níveis considerados brandos e intensos de desmineralização, respectivamente<sup>48,89,90</sup>.

Buscando identificar variações entre os componentes da superfície dentinária a partir das bandas representativas do COL1 e fosfato, foi calculado a razão relativa entre as áreas das bandas de amida III e fosfato. O cálculo feito a partir do espectro obtido da superfície de dentina mineralizada teve razão de 3,18. Como observado no espectro (Figura 24), a banda de fosfato tem maior intensidade em relação ao colágeno. Sendo assim a razão obtida é considerada de uma superfície sadia, e conseqüentemente o esperado de obter a partir de tratamentos remineralizantes. Após a aplicação de EDTA 17%, o espectro apresentou diferenças consideráveis em relação as bandas de amida III e fosfato, sendo a razão relativa calculada entre as suas áreas equivalente a 0,46 (Figura 24). Essa inversão indica que os cristais de apatita foram retirados da superfície a como consequência o COL1 se tornou mais exposto, portanto,

a banda de COL1 apresenta intensidade superior ao fosfato em condições da dentina desmineralizada<sup>48</sup>.

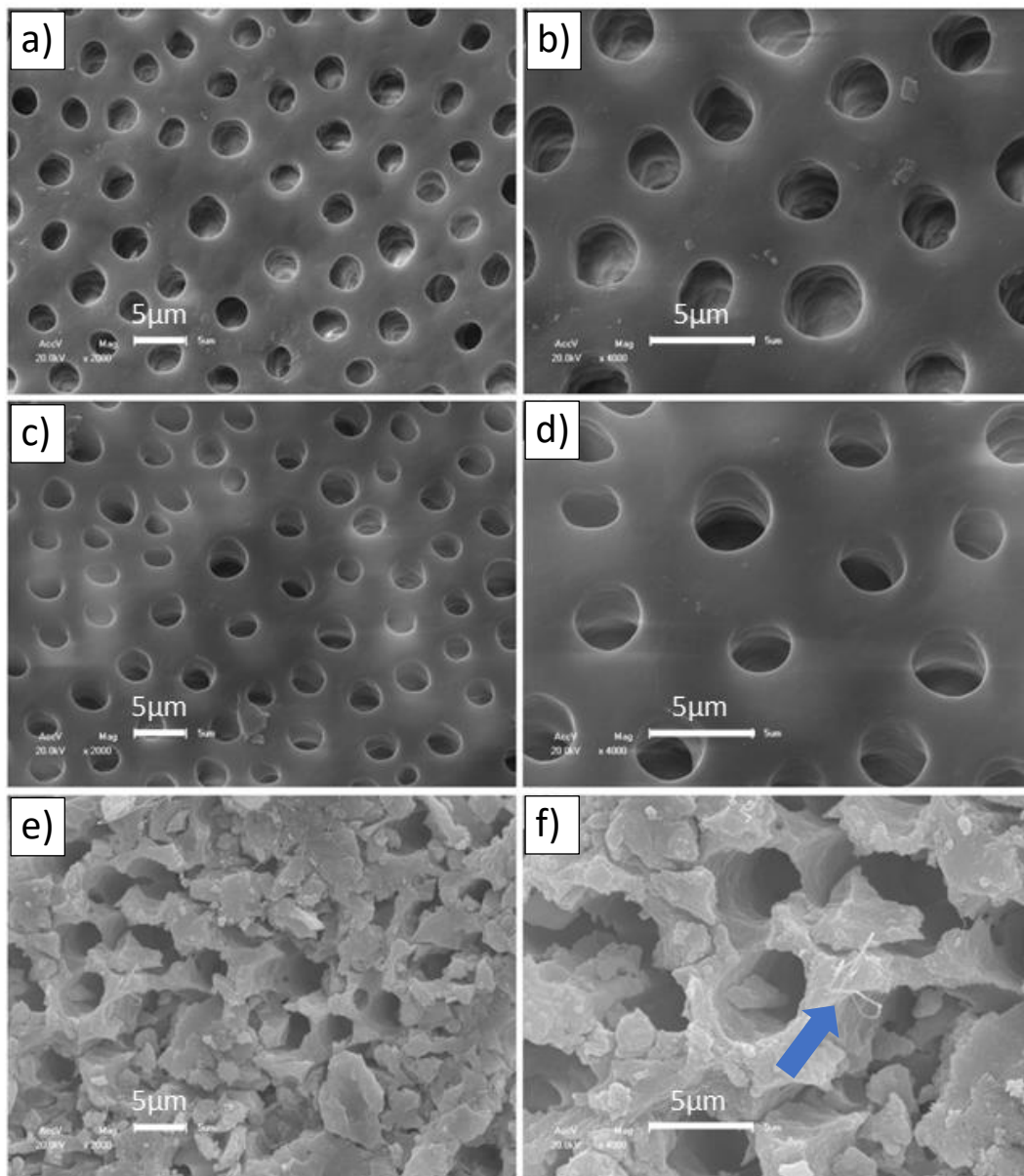


**Figura 24:** (a) Espectros ATR-FTIR da dentina mineralizada (preto) e da dentina após o processo de desmineralização com EDTA 17% (vermelho). Nota-se a inversão na intensidade das bandas de amida III e fosfato, indicando que o processo desmineralizante promoveu a retirada de cristais de apatita e maior exposição do COL1 na superfície dentinária. (b) Espectros da dentina mineralizada (preto) e da dentina após o processo de desmineralização com EDTA 1% (roxo). Nota-se a que há diminuição de intensidade da banda de fosfato em relação a de amida III, indicando que o processo desmineralizante promoveu a retirada de cristais de apatita, porém não tão significativa quanto ao tratamento com EDTA 17%.

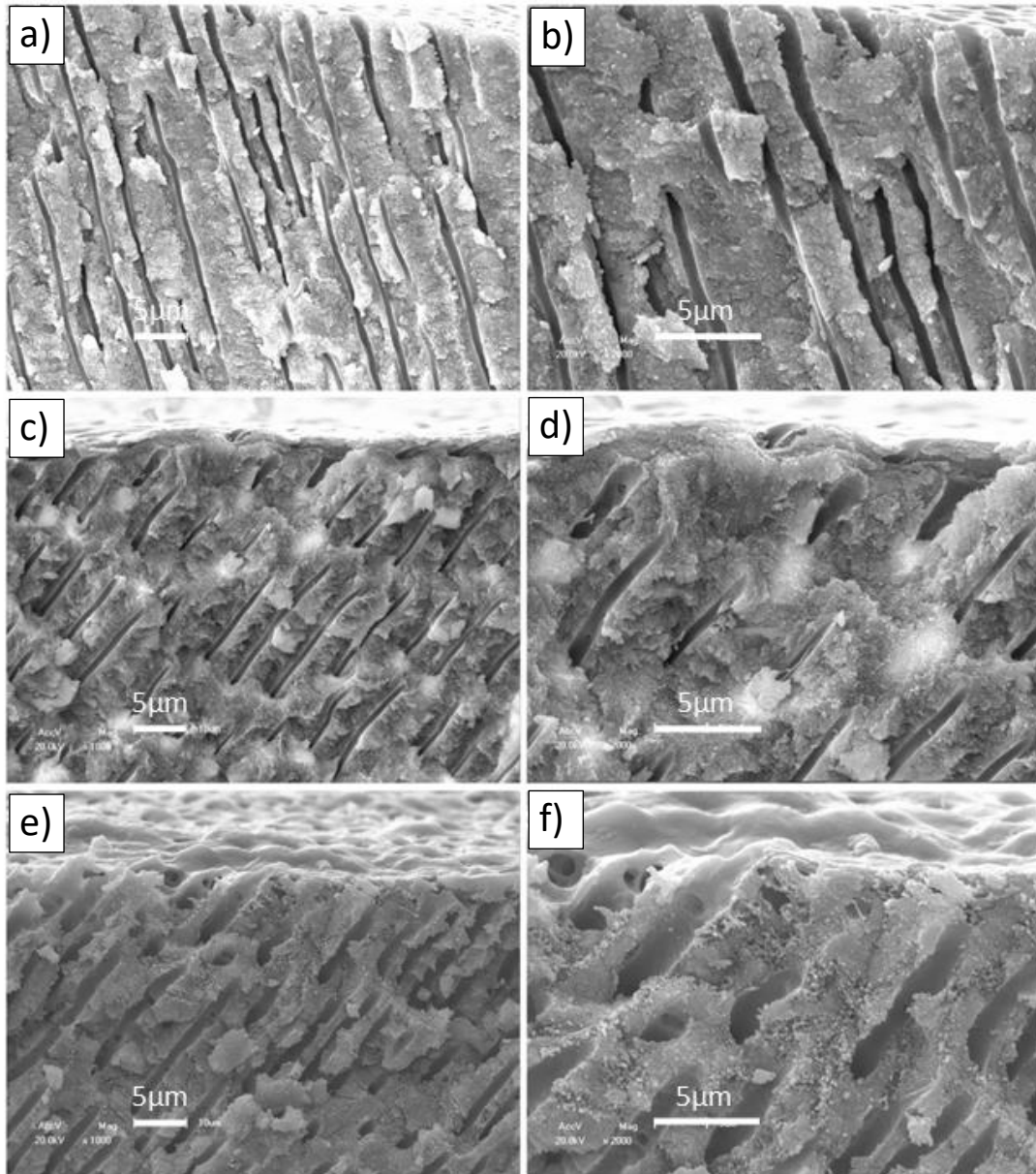
A desmineralização a partir do EDTA 1% indicou uma menor ação desmineralizante considerando a razão entre as bandas amida e fosfato (Figura 24). O valor 2,46 obtido para esta amostra é mais próximo ao valor obtidos para dentina mineralizada. Desmineralização menos intensa é capaz de desordenar as fibrilas colágenas, porém seu reordenamento ainda se torna possível nessas condições<sup>90</sup>.

As variações morfológicas superficiais e do interior dos túbulos após os tratamentos desmineralizantes foram investigadas por MEV. Nas imagens superficiais nota-se que não há diferença significativas na morfologia da dentina mineralizada (Figura 25.a e 25.b) e a desmineralizada com EDTA 1% (Figura 25.c e 25.d), corroborando os espectros na região do infravermelho. A mesma tendência é observada nas imagens de cortes transversais (Figura 26) que possibilitam notar túbulos com luz mais alargada após tratamento, entretanto nas regiões profundas encontra-se regiões peritubulares íntegras, indicando o baixo alcance de retirada da fase inorgânica.

Para a dentina tratada com EDTA 17% as modificações morfológicas foram nitidamente perceptíveis pelas imagens de MEV (Figura 25.e e 25.f). Houve o alargamento dos túbulos dentinários a ponto de perderem sua forma circular característica e normalmente bem definida. A região peritubular foi completamente retirada, tornando os túbulos consideravelmente mais largos não só na luz, mas em regiões mais internas (Figura 26.e e 26.f). Fica nítida a desorganização da matriz inorgânica superficial e a exposição da matriz colágena.



**Figura 25:** Micrografias eletrônicas das superfícies de discos de dentina mineralizada (a) e (b) desmineralizada com EDTA 1% (c) e (d) e desmineralizada com EDTA 17% (e) e (f). A seta na imagem f indica exposição de fibrilas de colágeno devido ao processo de desmineralização.



**Figura 26:** Micrografias eletrônicas dos cortes transversais de discos de dentina mineralizada (a) e (b) desmineralizada com EDTA 1% (c) e (d) e desmineralizada com EDTA 17% (e) e (f).

Compreender a energia livre de superfície de materiais, mais especificamente sua interação com fluidos, é compreender o grau de reatividade dos materiais. Este parâmetro é de suma importância em duas principais áreas da odontologia: para o entendimento da molhabilidade entre a superfície do dente e adesão de novos materiais, e para prever a capacidade dos materiais aderidos no dente evitarem a formação de biofilme dentário<sup>91</sup>. Neste estudo, a análise de variações na energia livre de superfície buscou investigar as modificações na composição do tecido dentinário, em diferentes níveis de desmineralização, e após aplicações de géis de NPs. Para isso, os valores de energia livre de superfície foram estimados a partir da medição do ângulo de contato utilizando diferentes líquidos polares e apolares<sup>92</sup>.

A retirada da fase inorgânica do tecido dentinário ocasiona o desbalanceamento entre as quantidades de componentes orgânicos e inorgânicos, e conseqüentemente altera a contribuição dos componentes polares e dispersivos da energia livre total de superfície desse tecido<sup>93</sup>. A dentina possui uma menor energia de superfície em comparação ao esmalte<sup>93</sup>, devido a presença de grande quantidade de COL1 e, portanto, uma considerável influência de interações dispersivas que interferem no espalhamento originando uma menor energia livre de superfície<sup>92</sup>. O fato desta menor energia livre de superfície é considerado um desafio para a restauração e aderência de resinas e diversos tratamentos no tecido dentinário, e para tanto, torna-se significativo que os tratamentos sobre esta superfície considerem a influência da energia livre, bem como de suas contribuições dispersiva e polar.

Os componentes que contribuem para a energia livre na superfície da dentina são as cadeias laterais dos aminoácidos que compõe as fibrilas de COL1 e os cristais de apatita que compõe a fase inorgânica deste biocompósito<sup>94</sup>. Na tabela 4 estão os valores da energia livre de superfície total dos discos mineralizados e desmineralizados com EDTA 1% e 17%, bem como o valor das componentes polares e dispersivas de cada superfície.

**Tabela 4.** Valores da energia livre de superfície (ELS), da componente dispersiva e da componente polar dos discos de dentina mineralizados, desmineralizados com EDTA 1% e desmineralizadas com EDTA 17%. Letras indicam comparação nos valores de ELS entre cada aplicação comparada a dentina mineralizada. Mesma letra indica similaridade estatística.

Dentina	ELS (mN/m)	Polar (mN/m)	Dispersiva(mN/m)
<b>Mineralizada</b>	67,58 <sup>a</sup> ± 0,16	44,93 ± 6,62	22,66 ± 6,78
<b>EDTA 1%</b>	62,77 <sup>b</sup> ± 0,65	25,79 ± 4,32	36,98 ± 3,37
<b>EDTA 17%</b>	55,35 <sup>c</sup> ± 0,78	17,02 ± 0,67	36,33 ± 1,37

Após aplicação de EDTA 17% o valor de energia livre caiu significativamente em comparação ao controle mineralizado, e devido ao fato da maior exposição de matriz colágena, a componente dispersiva passou a ter maior contribuição para a energia livre total. A diminuição da energia de superfície em amostra desmineralização indica menor propensão de adesão à esta superfície. Para o tratamento com EDTA 1% houve diminuição significativamente estatística da energia livre total comparada à amostra mineralizada, porém não tão intensa quanto a superfície exposta ao EDTA 17%. Nota-se também que houve inversão no valor das componentes polares e dispersivas, existindo maior contribuição da componente dispersiva indicando que, apesar de o tratamento ser mais ameno, houve retirada de fase inorgânica, ao menos o suficiente para afetar a contribuição da componente polar.

#### 4.3 TRATAMENTOS E CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DENTINÁRIAS

A primeira etapa de tratamentos utilizando as NPs carregadas buscou verificar a viabilidade de obliteração dos túbulos sobre superfícies mineralizada e desmineralizadas com EDTA 1%, utilizando as nanopartículas de 0%SrHAp e 10%SrHAp, carregadas por colágeno (0%SrHAp-COL, 10%SrHAp-COL) e PVA (0%SrHAp-PVA, 10%SrHAp-PVA). O objetivo foi investigar os tratamentos sobre superfície recém exposta, ou seja, com características químicas e morfológicas de um tecido mineralizado, bem como tratamentos sobre superfície com baixo grau de desmineralização<sup>90</sup>, e qual a influência entre os tipos de polímeros carregadores utilizados e a presença de 10% de Sr<sup>2+</sup> nas NPs.

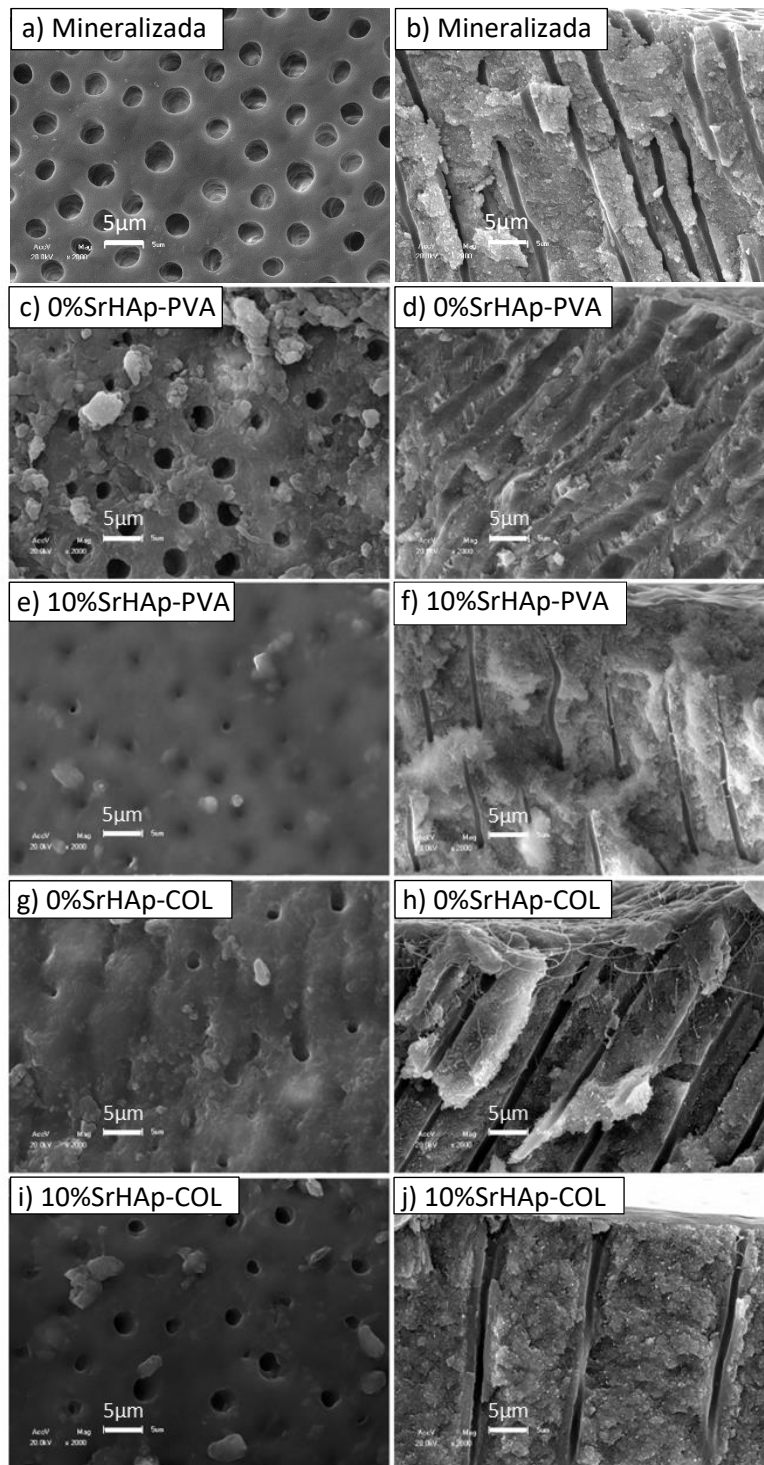
Os tratamentos consistiram em aplicações tópicas de géis de NPs sobre a superfície da dentina durante 1 min, 2 vezes ao dia, com um intervalo de 8 h<sup>56</sup>. Após 1 hora de cada aplicação os discos de dentina foram submetidos a desafio ácido (ácido cítrico 1%, pH 3,17)<sup>53</sup>, com intuito

de simular variações de pH ao qual o ambiente oral naturalmente está sujeito. Os discos de dentina foram armazenados a 37,5 °C em saliva artificial durante todo o processo até o final dos sete dias. Imagens de MEV dos tratamentos sobre as superfícies mineralizadas (Figura 27) mostram que houve eficiência na obliteração e diminuição dos diâmetros dos túbulos para os tratamentos realizados. Mesmo após a sequência de desafios ácidos, nota-se a permanência de uma camada sobre as superfícies decorrentes dos tratamentos com os géis de NPs. A mesma tendência foi investigada por imagens de MEV das superfícies previamente desmineralizadas com EDTA 1% (Figura 28), mostrando densa camada sobre a superfície e diminuição da luz do túbulo.

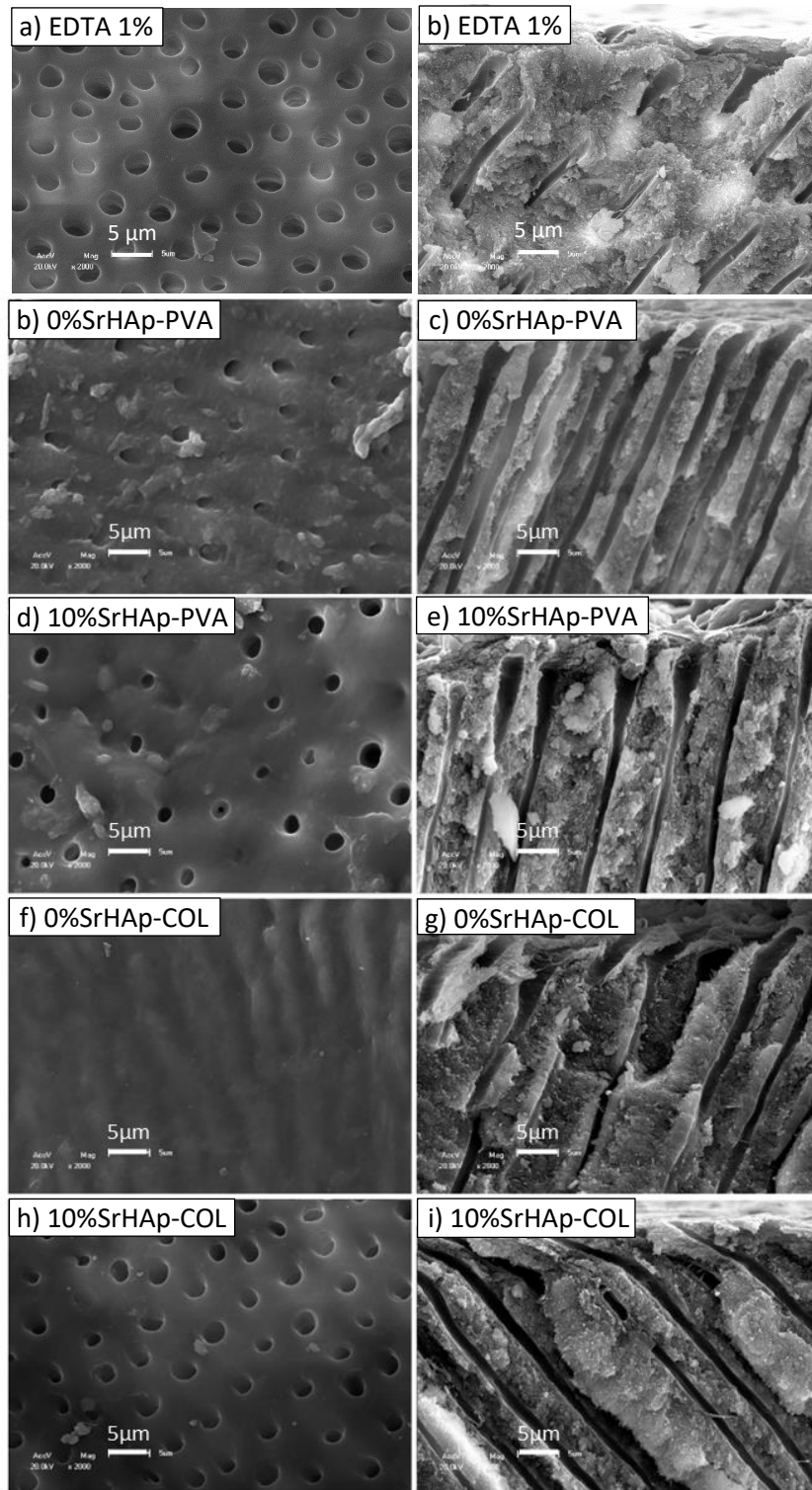
Nota-se nas imagens das fraturas (Figura 27.b e Figura 28.b), que o tratamento com 0%SrHAp-PVA, seja para a superfície previamente mineralizada ou desmineralizada, teve diminuição da dentina peritubular e consequente alargamento do diâmetro dos túbulos, indicando que o desafio ácido agiu de forma considerável na retirada de HAp nos túbulos dentinários. Contudo, os tratamentos feitos com 0%SrHAp-COL (Figura 27.f e Figura 28.f) resultaram de forma diferente, preservando o diâmetro dos túbulos bem como a incorporação de NPs em regiões mais internas dos túbulos, constatando diferença frente ao polímero carreador.

O tratamento de 10%Sr-HAp tanto com PVA quanto COL mostrou eficiência (Figura 27.d, 27.h e Figura 28.d, 28.h), visto que impediu na dentina mineralizada que o ataque ácido causasse aumento do diâmetro do túbulo bem como impediu que a dentina previamente desmineralizada tivesse avanço do aumento da luz do túbulo. De fato, a presença da incorporação do  $\text{Sr}^{2+}$  mostrou favorecer o tratamento independente do polímero carreador<sup>46</sup>.



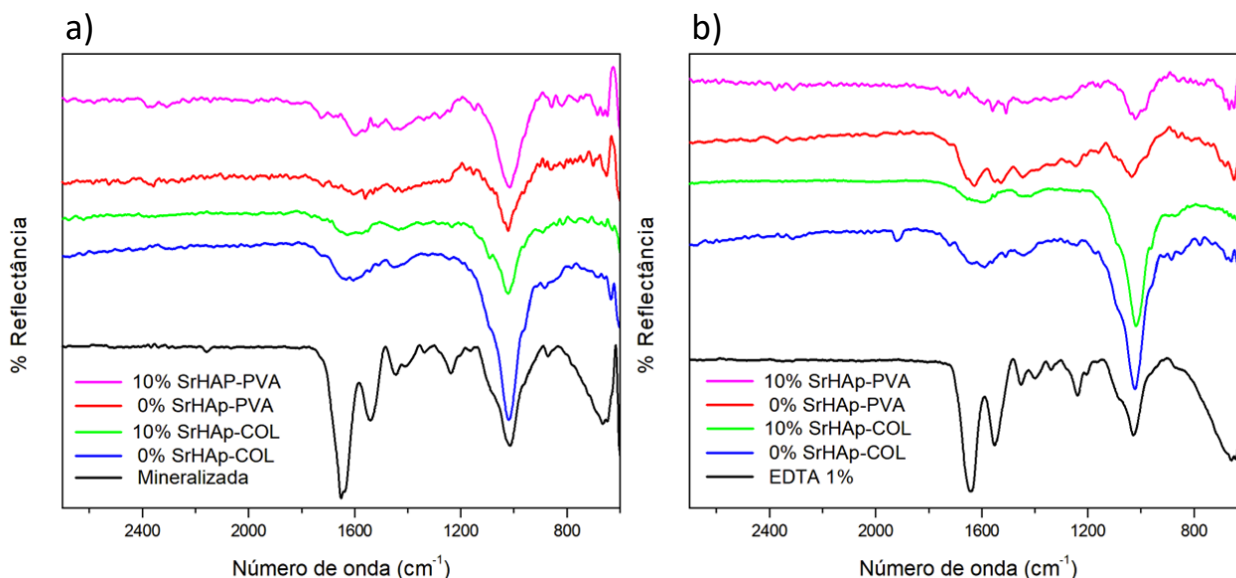


**Figura 27:** Micrografias eletrônicas de discos de dentina mineralizada (a) superficial (b) corte transversal, tratadas com 0%SrHAp-PVA (c) superficial (d) corte transversal, 10%SrHAp-PVA (e) superficial (f) corte transversal, 0%SrHAp-COL (g) superficial (h) corte transversal, 10%SrHAp-COL (i) superficial (j) corte transversal.



**Figura 28:** Micrografias eletrônicas de discos de dentina desmineralizadas com EDTA 1% **(a)** superficial **(b)** corte transversal, tratadas com 0%SrHAp-PVA **(c)** superficial **(d)** corte transversal, 10%SrHAp-PVA **(e)** superficial **(f)** corte transversal, 0%SrHAp-COL **(g)** superficial **(h)** corte transversal, 10%SrHAp-COL **(i)** superficial **(j)** corte transversal.

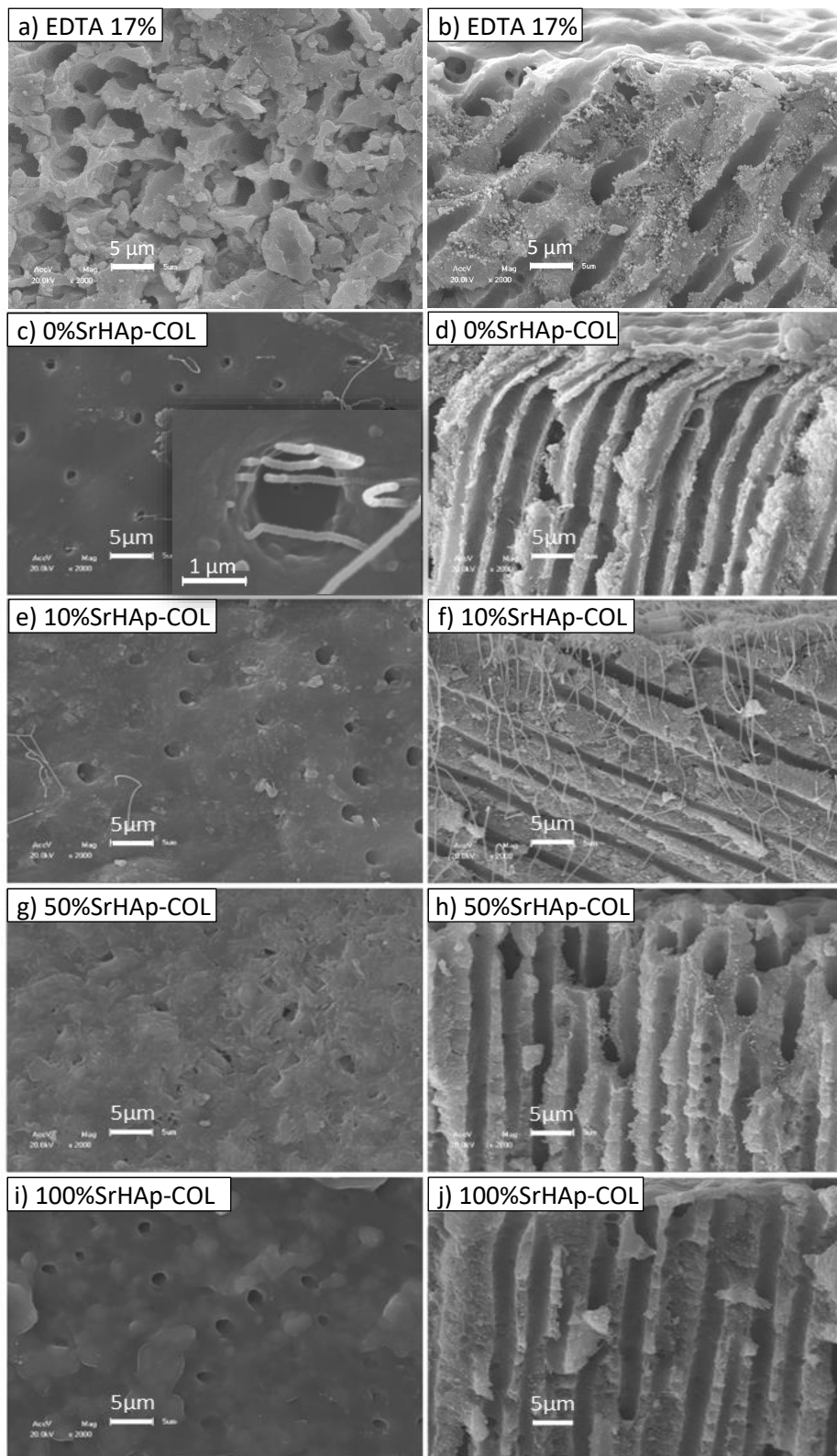
A partir dos espectros de ATR-FTIR é possível estudar possíveis mudanças da composição dentinária das superfícies, a partir das variações na intensidade e posição das bandas correspondentes à porção orgânica e inorgânica, após as sequências de tratamentos<sup>82</sup>. Os espectros obtidos mostraram variações nas intensidades das bandas, tanto em comparação ao controle mineralizado e desmineralizado com EDTA 1% (Figura 24.b), quanto entre os tratamentos (Figura 29). Os tratamentos com NPs carregadas com COL1 apresentaram bandas de fosfatos intensas em comparação às bandas referentes aos componentes orgânicos inerentes ao tecido dentinário, para as superfícies mineralizadas e desmineralizadas. Os tratamentos com PVA nos discos mineralizados (Figura 29.a) resultou em espectros parecidos aos tratamentos com COL1. Por outro lado, os tratamentos de PVA sobre as superfícies desmineralizadas apresentou um perfil dos espectros contendo as bandas de fosfato menos intensas em comparação as bandas correspondentes aos componentes orgânicos da matriz dentinária (Figura 29.b), indicando que o PVA tem um menor poder de retenção das NPs sobre a superfície da dentina quando comparada aos tratamentos contendo COL1. A possibilidade de adesão do PVA sobre superfícies mineralizadas já foi constatada para carbonatos de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$  quando aplicadas sobre superfícies dentinárias mineralizadas<sup>86</sup>.



**Figura 29:** Espectros dos tratamentos com géis de 0% SrHAp-COL, 0% SrHAp-PVA, 10% SrHAp-COL e 10% SrHAp-PVA sobre discos de dentina mineralizados (a) e desmineralizados com EDTA 1% (b).

A próxima sequência de tratamentos buscou verificar a viabilidade de obliteração dos túbulos sobre as superfícies desmineralizadas com EDTA 17%. Nesta etapa foram utilizadas as nanopartículas de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp, carreadas por COL1 e PVA. Imagens de MEV mostram que todos os tratamentos contendo COL1 (Figura 30) resultaram na diminuição do diâmetro e oclusão dos túbulos, com reconstituição da homogeneidade da superfície de forma similar às amostras mineralizadas. Nota-se a presença do colágeno em sua forma fibrilar, podendo ser identificada a formação de redes entrelaçadas e extensas de fibrilas que ficaram suspensas após a fratura dos discos. Em maiores ampliações (Figura 30.a) é possível ver as bandas periódicas característica das fibrilas de colágeno<sup>16</sup>, indicando que mesmo após aplicação e ataques ácidos, houve a manutenção da sua estrutura supramolecular.

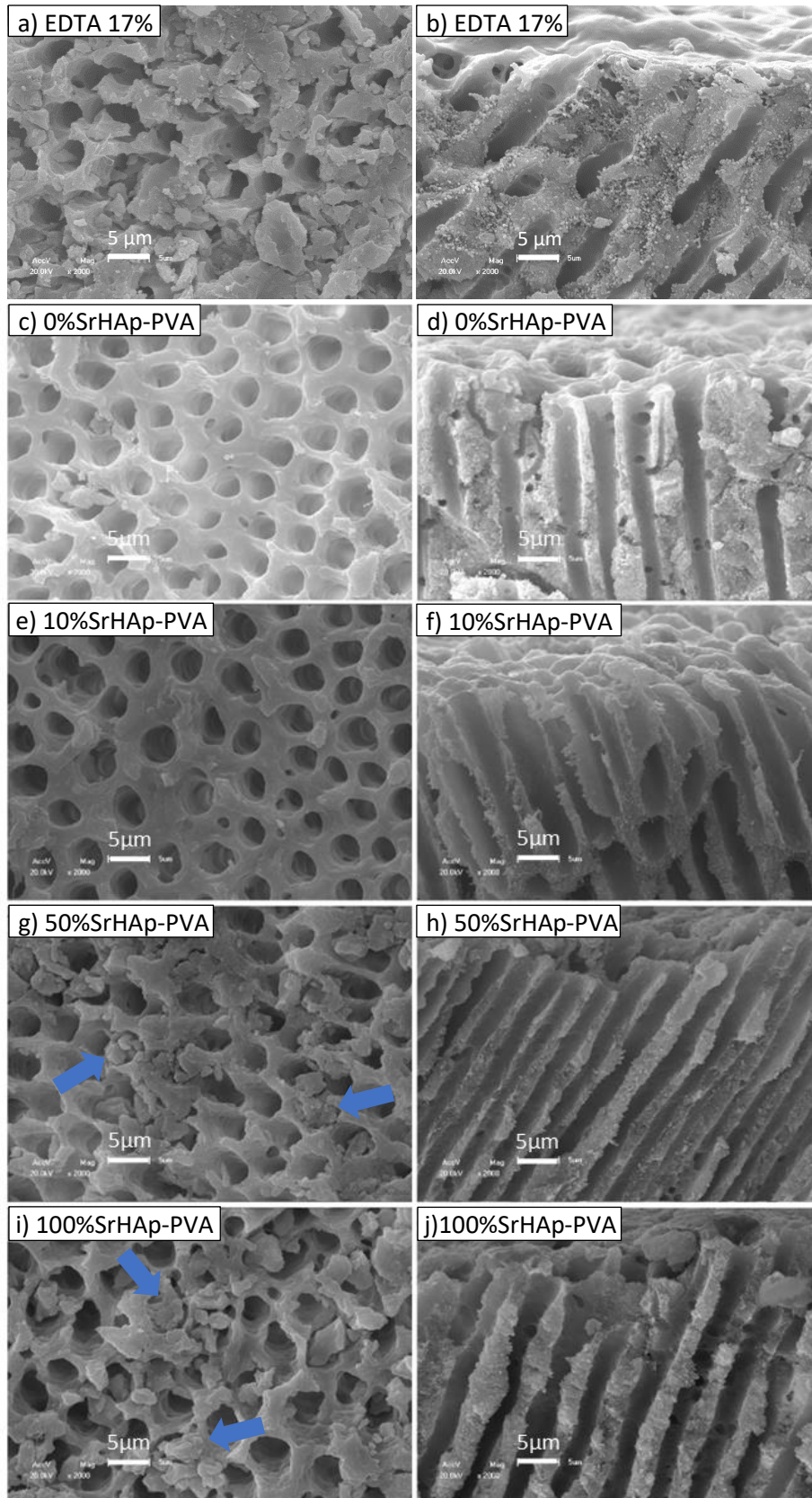
A rede “COL-NPs” mostrou-se homogênea sobre as superfícies como verificado pelas imagens de MEV. Esta homogeneidade pode ser justificada pela rede formada por meio do entrelaçamento das fibrilas de colágeno com as nanopartículas, que foi capaz de se sobrepor nos túbulos e conseqüentemente obliterá-los. Nota-se pelas imagens das fraturas que não há o preenchimento dos túbulos com COL1 e NPs, nem mesmo nas regiões mais próximas da luz do túbulo. Considerando que a estrutura da dentina tubular é atuante no processo de defesa do complexo dentina-polpa, uma vez que nos túbulos são encontradas imunoglobulinas capazes de impedir invasões bacterianas, além da possibilidade de detectar alterações por meio das terminações nervosas, torna-se importante a manutenção desta estrutura<sup>7</sup> que de fato foi permitida com o tratamento contendo das NPs carreadas por COL.



**Figura 30:** Micrografias eletrônicas de discos de dentina desmineralizadas com EDTA 17% (a) superficial (b) corte transversal, tratadas com 0%SrHAp-COL (c) superficial (d) corte transversal, 10%SrHAp-COL (e) superficial (f) corte transversal, 50%SrHAp-COL (g) superficial (h) corte transversal, 100%SrHAp-COL (i) superficial (j) corte transversal.

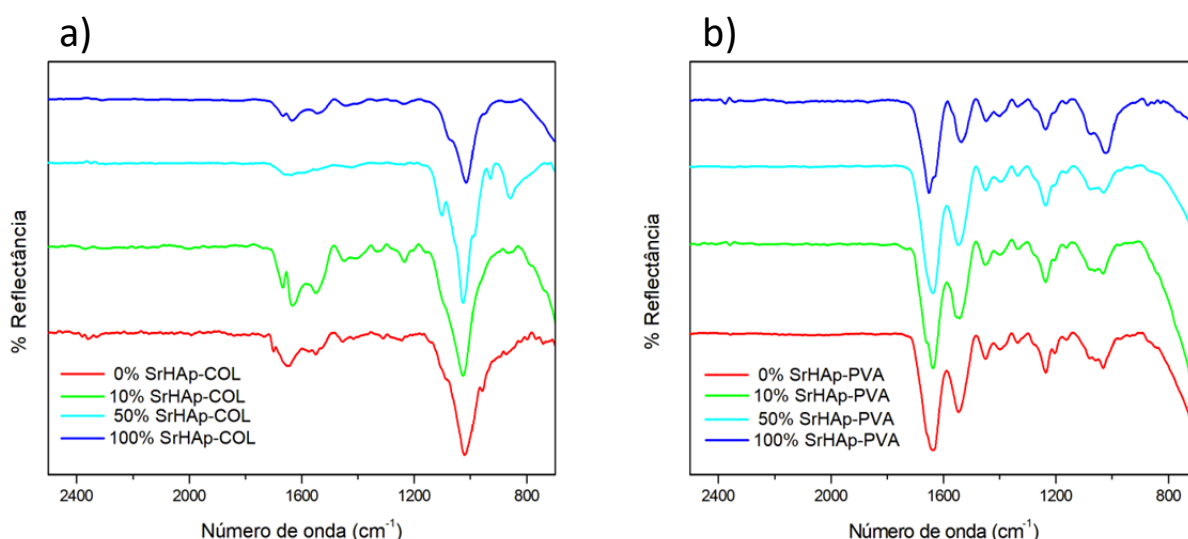
Imagens de MEV dos tratamentos de NPs carregadas com PVA (Figura 31) não causaram recobrimento efetivo sobre as superfícies desmineralizadas, uma vez que os túbulos permanecem expostos. Nota-se que nas regiões intertubulares há presença de deposições de NPs, porém sem formação de uma recobrimento denso capaz de recobrir os túbulos. A estrutura superficial é semelhante à da amostra desmineralizada, antes do tratamento (Figura 25.e). Nos tratamentos com 50%SrHAp-PVA e 100%SrHAp-PVA são encontrados alguns aglomerados nos túbulos (indicado por seta na Figura 31), indicando que para essas NPS ocorreu melhor adesão nas regiões intertubulares. Pelo fato de a dentina ser um substrato com uma estrutura orgânica complexa e de atividade biológica, estabelecer uma ligação eficiente é mais difícil em comparação ao esmalte<sup>95</sup>. Pensando em materiais para adesão à dentina, tem-se buscado utilizar monômeros hidrofílicos dissolvidos em um solvente orgânico para se ligarem as fibrilas de colágeno formando um tecido híbrido. Caso essa camada não esteja bem alocada pode ocorrer degradação hidrolítica<sup>95</sup>. A utilização do PVA em aplicações médicas tem sido relatada devido a este polímero sintético ser biodegradável, biocompatível, citocompatível, ter baixa toxicidade e boas propriedades mecânicas<sup>96</sup>. Portanto, seu uso tem sido investigado para tratamentos no tecido dentinário<sup>96,97</sup>. Sua estrutura é caracterizada por hidroxilas em cada segundo átomo de carbono, sendo a disponibilidade de hidroxila torna possível a reticulação física por meio de ligações de hidrogênio<sup>98</sup>. Segundo as imagens de MEV, a ligação do PVA com a superfície dentinária não foi resistente ao desafio ácido, sendo concentradas somente nas regiões peritubulares, permitindo a manutenção de retículos cristalinos nessas regiões antes completamente desmineralizadas.

Partículas de ordem de grandeza nanométrica, tendem a se ligar às fibrilas de colágeno desmineralizado, tendendo a formação de aglomerados superficiais<sup>99</sup>. Em todos os tratamentos realizados neste trabalho foram identificados aglomerados sobre as superfícies, que estão em concordância com o tamanho nanométrico das NPs sintetizadas e aplicadas. Ao considerar o processo de remineralização deve-se levar em consideração a ligação colágeno-NP, sendo que a incapacidade desta ligação leva a potenciais de remineralização limitados. A dentina desmineralizada resulta em uma superfície de colágeno carregada positivamente, consequentemente apresentando afinidade às partículas carregadas negativamente<sup>99</sup>. Esse fator leva a entender o fato de as NPs formarem aglomerados superficiais e não incorporarem, preenchendo completamente nos túbulos.



**Figura 31:** Micrografias eletrônicas de discos de dentina desmineralizadas com EDTA 17% (a) superficial (b) corte transversal, tratadas com 0%SrHAp-PVA (c) superficial (d) corte transversal, 10%SrHAp-PVA (e) superficial (f) corte transversal, 50%SrHAp-PVA (g) superficial (h) corte transversal, 100%SrHAp-PVA (i) superficial (j) corte transversal.

Espectros ATR-FTIR das amostras desmineralizadas com EDTA 17% tratadas com NPs contendo COL1 mostraram variações significativas da composição superficial a partir de mudanças nas bandas de amida III e fosfato (Figura 32). As razões entre as bandas de  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_3 \sim 1025 \text{ cm}^{-1}$ ) e amida III ( $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$ ) calculadas para os tratamentos com COL1 foram maiores em comparação ao valor dos controles mineralizados e desmineralizados (Tabela 5). A superfície em que houve aplicação do tratamento de 50%SrHAp-COL não foi possível de calcular devido ao não aparecimento da banda de amida III. As demais razões foram muito superiores ao valor do controle desmineralizado (0,46) e mineralizado (3,18). Esse resultado indica que a superfície dentinária está recoberta por hidroxiapatita, proveniente dos tratamentos e modificando o perfil químico da dentina desmineralizada.



**Figura 32:** Espectros dos tratamentos com géis de 0%SrHAp-COL, 10%SrHAp-COL, 50%SrHAp-COL e 100%SrHAp-COL (a). Espectros dos tratamentos com géis de 0%SrHAp-PVA, 10%SrHAp-PVA, 50%SrHAp-PVA e 100%SrHAp-PVA (b). Ambos os tratamentos feitos sobre superfícies desmineralizadas com EDTA 17%.

**Tabela 5:** Razões relativas entre as áreas das bandas de fosfato e amida III após os tratamentos com NPs carreadas com COL1 e PVA sobre a superfície dos discos desmineralizados com EDTA 17%.

Tratamentos	0%SrHAp		10%SrHAp		50%SrHAp		100%SrHAp	
	PVA	COL1	PVA	COL1	PVA	COL1	PVA	COL1
<b>Razão <math>\text{PO}_4^{3-}</math> /AmidaIII</b>	1,34	26,36	1,21	25,95	1,04	*	3,18	34,81

\*Razão não calculada, devido ausência da banda de amida III.

Com perfil completamente diferente das amostras tratadas com as NPs contendo COL1, os espectros FTIR das superfícies dentinárias após os tratamentos com as NPs contendo PVA



indicaram a presença de bandas intensas relacionadas à matriz orgânica do tecido dentinário, quando comparadas a banda de fosfato. Os valores das razões entre as bandas de  $\text{PO}_4^{3-}$  e amida III foram inferiores, ou equivalentes ao valor da razão de dentina mineralizada, porém foram superiores a razão do controle da superfície desmineralizada, indicando deposição mineral parcial. Portanto, apesar de nenhum destes tratamentos com PVA provocarem a obliteração dos túbulos, eles promoveram modificação na dentina intertubular corroborando as imagens de MEV, indicando a deposição de hidroxiapatita na matriz orgânica exposta pela desmineralização e, portanto, capaz de acomodar estes cristais.

Após cada tratamento também foi investigada a variação da energia livre de superfície das amostras de dentina (Tabela 6). Nota-se que todos os tratamentos contendo COL1 como carreador mostraram alteração na energia livre de superfície para valores mais elevados em comparação ao controle desmineralizado. Valores mais altos são característicos da superfície contendo hidroxiapatita e conseqüentemente menor exposição de colágeno. A literatura aponta valores para energia livre de superfície para a dentina mineralizada de  $70,7 \pm 3,1 \text{ mN/m}^{100,101}$ ,  $69,1 \pm 2,1 \text{ mN/m}^{102}$  que são similares aos valores encontrados neste projeto para as superfícies de dentina mineralizada e para as superfícies após tratadas com as NPs contendo COL1. Devido à presença das NPs a contribuição da componente polar mostrou aumento em relação a dispersiva, indicando a mudança de perfil de superfície desmineralizada para um perfil equivalente à superfície mineralizada.

Os tratamentos contendo PVA mostraram aumento da energia livre de superfície, para valores condizentes a dentina mineralizada, proporcionalmente à quantidade de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado nas NPs (Tabela 6), indicando que as NPs com maior quantidade de  $\text{Sr}^{2+}$  conseguem se ligar mais efetivamente na rede de colágeno exposta. Fato este que está em concordância com o aumento dos valores de contribuição polar para o tratamento de 100%SrHAp-PVA. Resultados estes que corroboram aos espectros de FTIR evidenciando que, apesar de não obstruir os túbulos, as NPs ficam retidas nas regiões intertubulares que contém fibrilas de COL1 expostas. A presença dos grupos hidroxila proveniente do PVA também ajudam a explicar o aumento da energia livre<sup>103</sup>.

A presença do COL1 como carreador promoveu a manutenção das NPs sobre a superfície dentinária, independente da presença ou ausência de  $\text{Sr}^{2+}$  na NP, evidenciando a presença da rede de fibrilas colágenas como um fator diferencial para incorporação da fase inorgânica. Por outro lado, com um carreador não efetivo, a presença de  $\text{Sr}^{2+}$  torna-se

significativa, sendo capaz de ser mais retida as NPs que contém maior quantidade de Sr<sup>2+</sup> incorporado.

**Tabela 6.** Valores da energia livre de superfície (ES), da componente dispersiva e da componente polar dos discos de dentina previamente desmineralizados com EDTA 17% posteriormente tratadas com as NPs carreadas por COL1 e PVA.

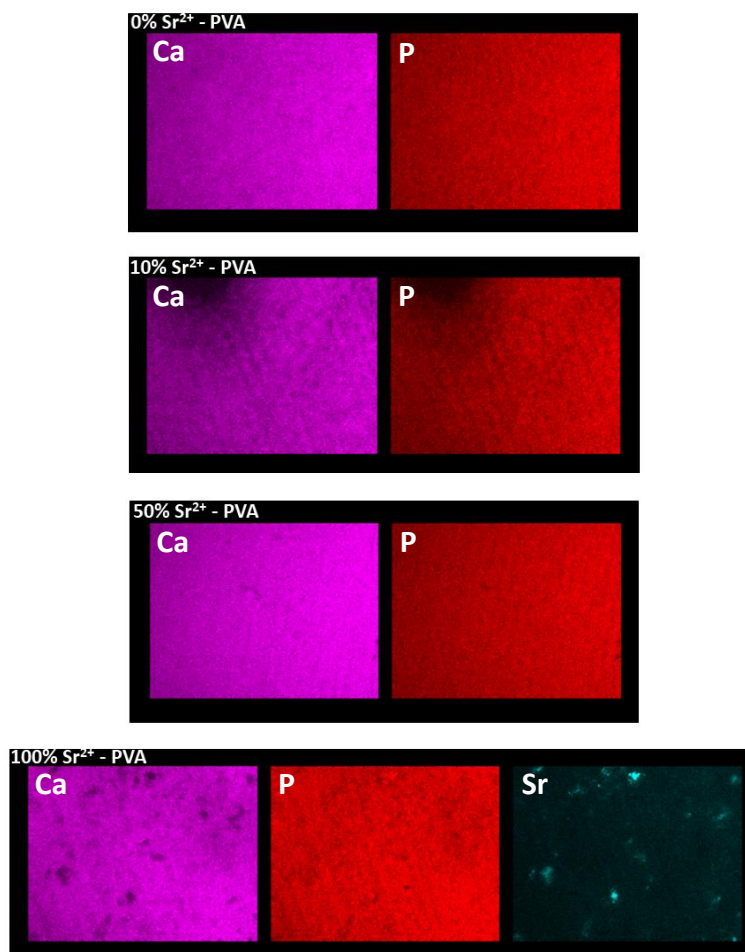
TRATAMENTOS	ES (mN/m)	Polar (mN/m)	Dispersiva (mN/m)
<b>0%Sr-COL</b>	70,94 <sup>aA</sup> ± 0,53	43,44 ± 0,99	27,50 ± 0,54
<b>10%Sr-COL</b>	69,33 <sup>bcBC</sup> ± 0,39	41,70 ± 0,82	27,63 ± 0,44
<b>50%Sr-COL</b>	71,19 <sup>cbdCBD</sup> ± 0,04	44,19 ± 0,18	27,00 ± 0,14
<b>100%Sr-COL</b>	69,14 <sup>dceDC</sup> ± 1,24	42,96 ± 2,08	26,17 ± 0,99
<b>0%Sr-PVA</b>	53,88 <sup>edfA</sup> ± 1,61	31,01 ± 3,54	22,88 ± 2,79
<b>10%Sr-PVA</b>	58,63 <sup>fegB</sup> ± 4,00	37,26 ± 6,02	21,36 ± 2,79
<b>50%Sr-PVA</b>	63,15 <sup>gfhC</sup> ± 3,43	37,01 ± 2,57	26,14 ± 1,01
<b>100%Sr-PVA</b>	68,23 <sup>hgD</sup> ± 0,88	49,93 ± 4,61	18,29 ± 5,51

\*Letras minúsculas indicam comparação entre todos os tratamentos. Letras maiúsculas indicam comparação nos grupos de COL1 e PVA. Mesma letra indica similaridade estatística.

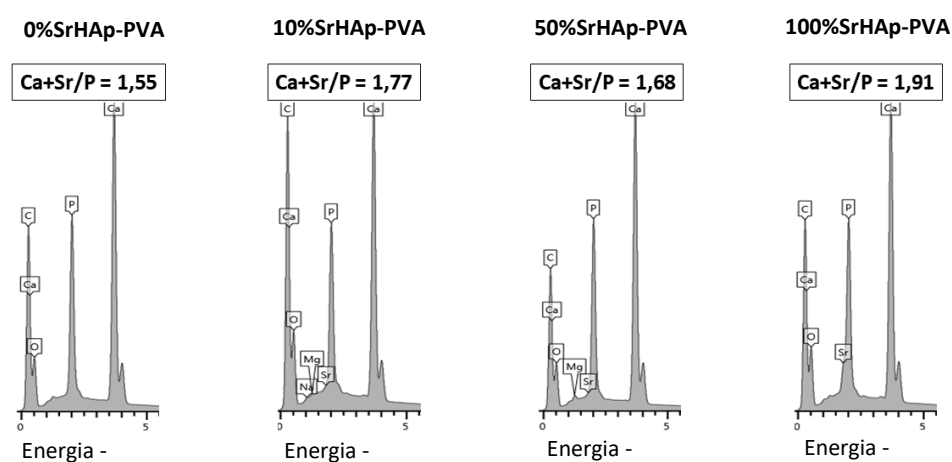
Buscando verificar a presença e possível variação na concentração dos elementos Ca, Sr e P frente aos tratamentos nas superfícies dentinárias, bem como sua distribuição sobre a superfície, foi realizada análise e mapeamento elementar por meio de EDS das superfícies desmineralizadas com EDTA 17% após 7 dias de tratamento, com as NPs de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp com PVA e COL1. Os resultados dos tratamentos contendo NPs carreadas por PVA (Figura 33) indicaram diferenças nas superfícies após os 7 dias de tratamentos. As razões atômicas Ca+Sr/P, calculadas para as superfícies tratadas com NPs contendo 10%, 50% e 100% de Sr<sup>2+</sup> incorporado, mostraram valores próximos à dentina mineralizada (~1,67). A superfície tratada com 0%SrHAp-PVA resultou em menor razão, indicando estar mais suscetível ao desafio ácido, em concordância com as imagens de MEV (Figura 31.a), e, portanto, com menor quantidade de NPs depositadas. A maior razão para 100%SrHAp-PVA reforça a maior capacidade de deposição das NPs na matriz exposta em comparação as outras NPs carreadas por PVA em concordância com as análises de infravermelho, MEV e energia livre de superfície. Por meio do mapa elementar foi possível identificar a deposição de Sr<sup>2+</sup> apenas na amostra tratada com 100%SrHAp-PVA. Para as amostras tratadas com 10%SrHAp-PVA e 50%SrHAp-PVA não se identificou nos mapas elementares a presença de Sr<sup>2+</sup>, porém a presença dos picos relacionados a este elemento no espectro indica que estão presentes, mesmo que em baixa quantidade.

Para as superfícies tratadas com NPs carregadas por COL1 (Figura 34), as razões atômicas Ca+Sr/P nas superfícies após os tratamentos mostraram proximidade aos valores característicos de um tecido mineralizado (~1,67), porém os tratamentos de 50%SrHAp-COL e 100%SrHAp-COL mostraram valores muito superiores. Os mapas elementares indicaram a presença de Sr<sup>2+</sup> em todos os tratamentos com NPs contendo este elemento (Figura 34.a), indicando que o colágeno favoreceu a ligação à superfície, de forma mais efetiva que o PVA, que não se mostrou resistente ao desafio ácido, não conseguindo manter as nanoestruturas sobre a superfície (Figura 33.a). Os resultados de EDS corroboram ao estudo feito por Geevarghese et al em que foram verificados a capacidade de NPs de HAp contendo Sr<sup>2+</sup> e carregadas por quitosana aplicadas ao tecido dentinário, mostrando que houve um aumento das quantidades de cálcio e fosfato comparados a dentina desmineralizada e tratadas com HAp pura, sendo este aumento proporcional à quantidade de Sr<sup>2+</sup> incorporado. O mesmo estudo indicou maior eficiência de deposição da matéria inorgânica quando carregada por um biopolímero em comparação a soluções remineralizantes<sup>46</sup>.

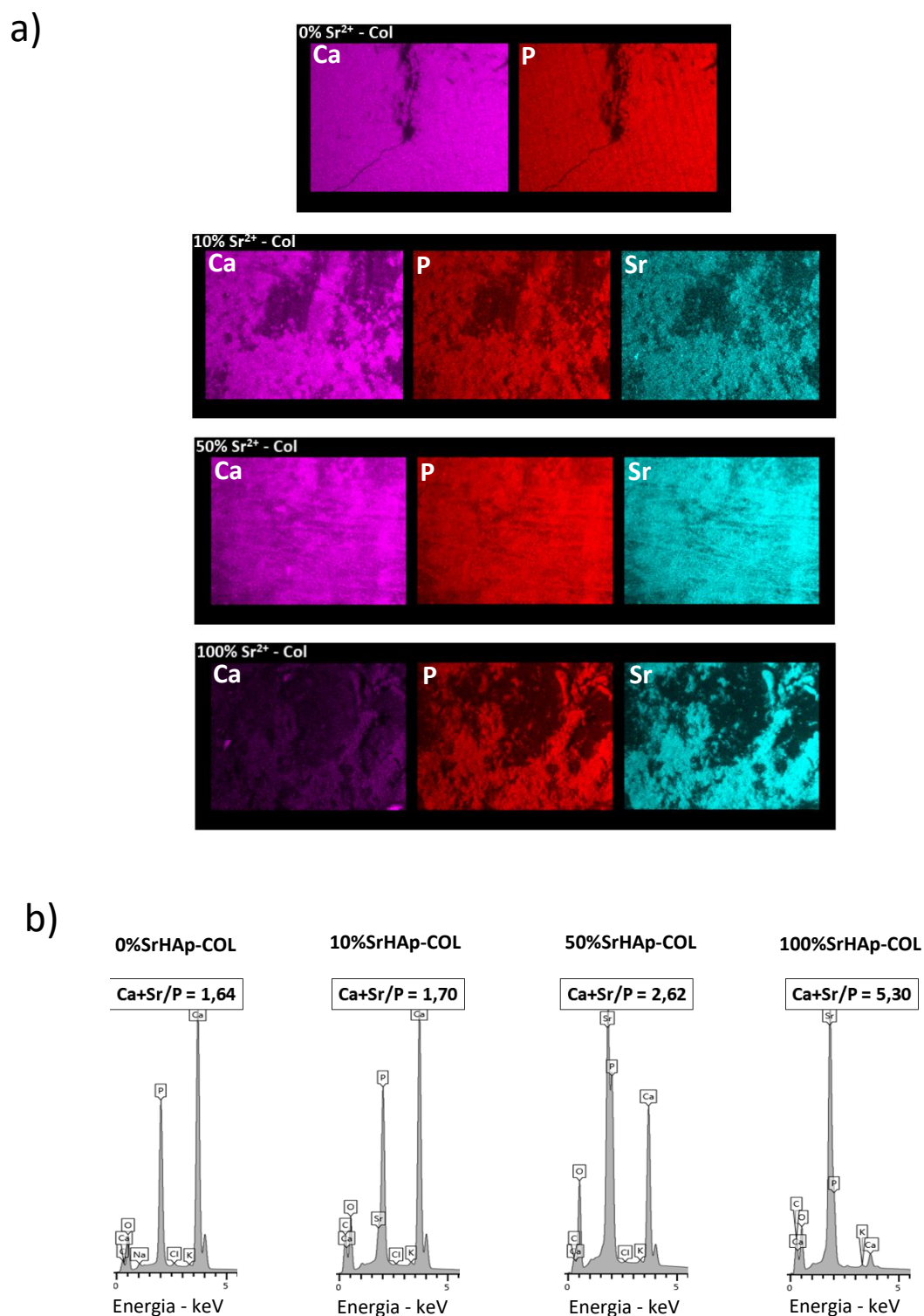
a)



b)



**Figura 33:** Resultados de EDS obtidos das superfícies tratadas com NPs contendo PVA após sete dias de tratamento incluindo as etapas de desafio ácido (a) Mapas elementares de Ca, Sr e P das superfícies dos discos de dentina desmineralizadas com EDTA 17% tratadas com 0%SrHAp-PVA, 10%SrHAp-PVA, 50%SrHAp-PVA e 100%SrHAp-PVA. (b) Espectros de EDS obtidos das superfícies dos discos de dentina desmineralizadas com EDTA 17% tratadas com 0%SrHAp-PVA, 10%SrHAp-PVA, 50%SrHAp-PVA e 100%SrHAp-PVA.



**Figura 34:** Resultados de EDS obtidos das superfícies tratadas com NPs contendo COL1 após sete dias de tratamento incluindo as etapas de desafio ácido (a) Mapas elementares de Ca, Sr e P das superfícies dos discos de dentina desmineralizadas com EDTA 17% tratadas com 0%SrHAp-COL, 10%SrHAp-COL, 50%SrHAp-COL e 100%SrHAp-COL. (b) Espectros de EDS obtidos das superfícies dos discos de dentina desmineralizadas com EDTA 17% tratadas com 0%SrHAp-COL, 10%SrHAp-COL, 50%SrHAp-COL e 100%SrHAp-COL.

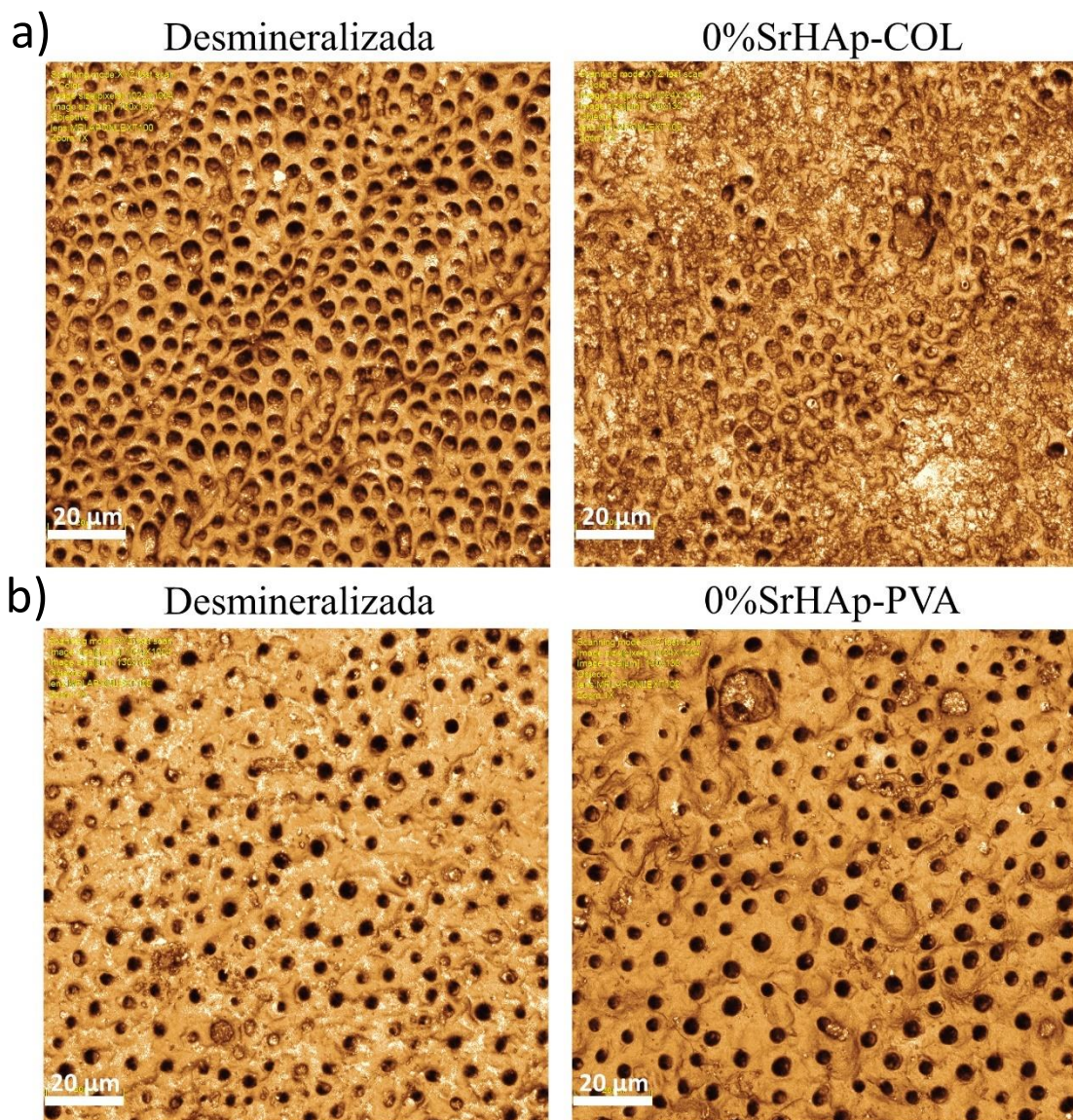
#### 4.4 INVESTIGAÇÃO DE OBLITERAÇÃO DOS TÚBULOS E ENSAIO DE PERMEABILIDADE

Microscopia confocal foi utilizada para análise qualitativa e quantitativa para avaliação das alterações morfológicas após tratamentos das superfícies dentinárias com as NPs e correlacioná-los aos resultados de permeabilidade<sup>104</sup>. As superfícies que tiveram aplicações de NPs com COL1 resultaram na diminuição dos números de túbulos expostos para as NPs com todas as porcentagens de  $Sr^{2+}$  (Figura 35.a, Figura 36.a, Figura 37.a e Figura 38.a), sendo o tratamento que promoveu o maior grau de obliteração o de 50%SrHAp-COL (Figura 37.a e Tabela 9). Houve também diminuição da área dos túbulos que restaram expostos após os ciclos (Tabelas 7,8,9,10). As aplicações que continham NPs-PVA mostrou-se ineficiente na obliteração para todas as NPs utilizadas, havendo manutenção ou aumento da quantidade de túbulos expostos e tamanho médio da área destes túbulos (Figura 35.b, Figura 36.b, Figura 37.b e Figura 38.b e Tabela 7, Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10). Por mais que a diminuição das áreas dos túbulos nos tratamentos com colágeno não tenham sido significativas estatisticamente, deve-se levar em consideração que houve o decréscimo significativo do número de túbulos expostos, portanto diminuindo a quantidade de acessos que resultam em movimentação do fluido tissular.

Testes *in vitro* de dentifrícios contendo cálcio e fosfato são encontrados na literatura para verificar sua efetividade de oclusão e diminuição de permeabilidade<sup>105</sup>. Nestes testes da literatura, os dentifrícios mostraram-se efetivos após a aplicação, proporcionando obliteração dos túbulos e diminuição de permeabilidade, comprovando a deposição dos princípios ativos no substrato dentinário, entretanto não foram capazes de suportar os desafios químicos e mecânicos<sup>105</sup>. Dentifrícios contendo NPs de HAp também não mostram resistência ao desafio ácido quando utilizadas em formulações comerciais<sup>105</sup>.

Considerando o efeito da quantidade de  $Sr^{2+}$  incorporado nas NPs e sua adesão na superfície dentinária, a microscopia confocal verificou o mesmo efeito observado nas imagens de MEV, análises de infravermelho e medidas de energia livre de superfície. Este efeito consiste no tratamento das NPs com COL1 promoverem a adesão das NPs sobre a superfície independentemente do nível de incorporação de  $Sr^{2+}$ , obliterando os túbulos com uma densa camada. Entretanto o tratamento com 50%SrHAp se destaca entre os demais com COL1 (Figura 37.a). Considerando que esta NP tem a estrutura amorfa e, portanto, estrutura muito diferente das demais NPs como observado pela MET, sua dinâmica de distribuição sobre a superfície foi

diferente das demais tornando-se mais homogênea e, portanto, indicando a incorporação de 50% de  $\text{Sr}^{2+}$  como favorável para uma distribuição sobre a superfície desmineralizada e consequentemente sua interação com o COL1. Para os tratamentos de NPs com PVA, a quantidade de  $\text{Sr}^{2+}$  não teve influência significativa em relação ao número de túbulos obliterados de acordo de sua porcentagem nas NPs, já que o nível de obliteração foi baixo para todos os tratamentos com PVA. Sendo assim, verifica-se que o carreador é um fator determinante frente às variações as quais o ambiente oral está exposto, e sua interação está associada à sua a recuperação da fase inorgânica e característica mineralizada da dentina.

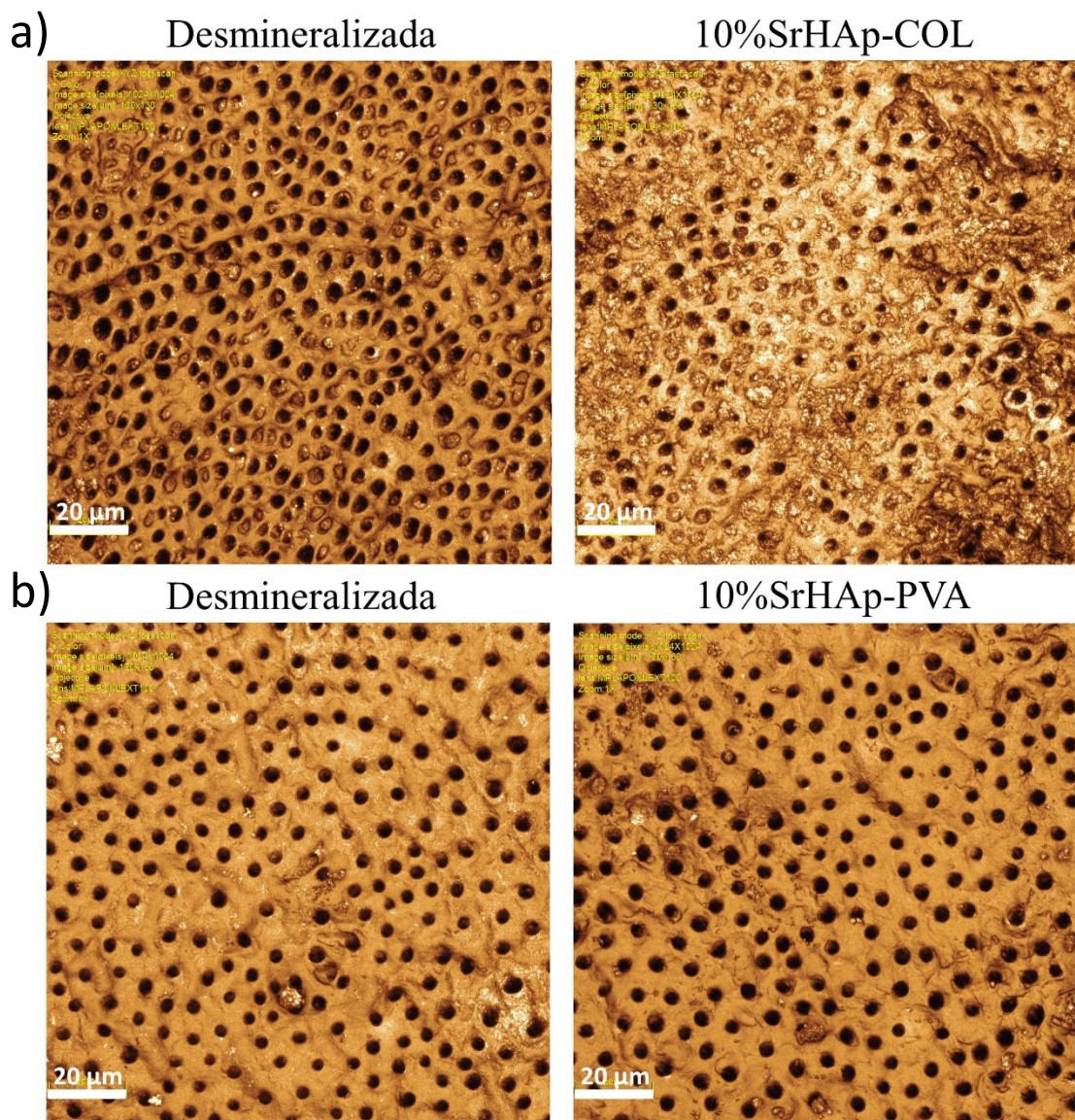


**Figura 35:** Imagens obtidas por microscopia confocal de regiões de discos de dentina desmineralizados e após o tratamento feito com 0%SrHAp-COL (a) e 0%SrHAp-PVA (b). As imagens foram obtidas de regiões próximas para verificar a variação na morfologia tubular.

**Tabela 7.** Número e área média ( $\mu\text{m}^2$ ) dos túbulos de uma região em uma área de  $130 \times 130 \mu\text{m}^2$  da superfície dentinária antes e após o tratamento com 0%SrHAp-COL e 0%SrHAp-PVA.

Discos	0%SrHAp-COL		0%SrHAp-PVA	
	Túbulos	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Túbulos	Área ( $\mu\text{m}^2$ )
Desmineralizados	485	$10,66^a \pm 6,67$	231	$7,18^a \pm 3,95$
Tratados	29	$3,41^a \pm 1,50$	211	$7,80^a \pm 2,99$

\*Letras indicam comparação nos grupos de COL1 e PVA. Mesma letra indica similaridade estatística.



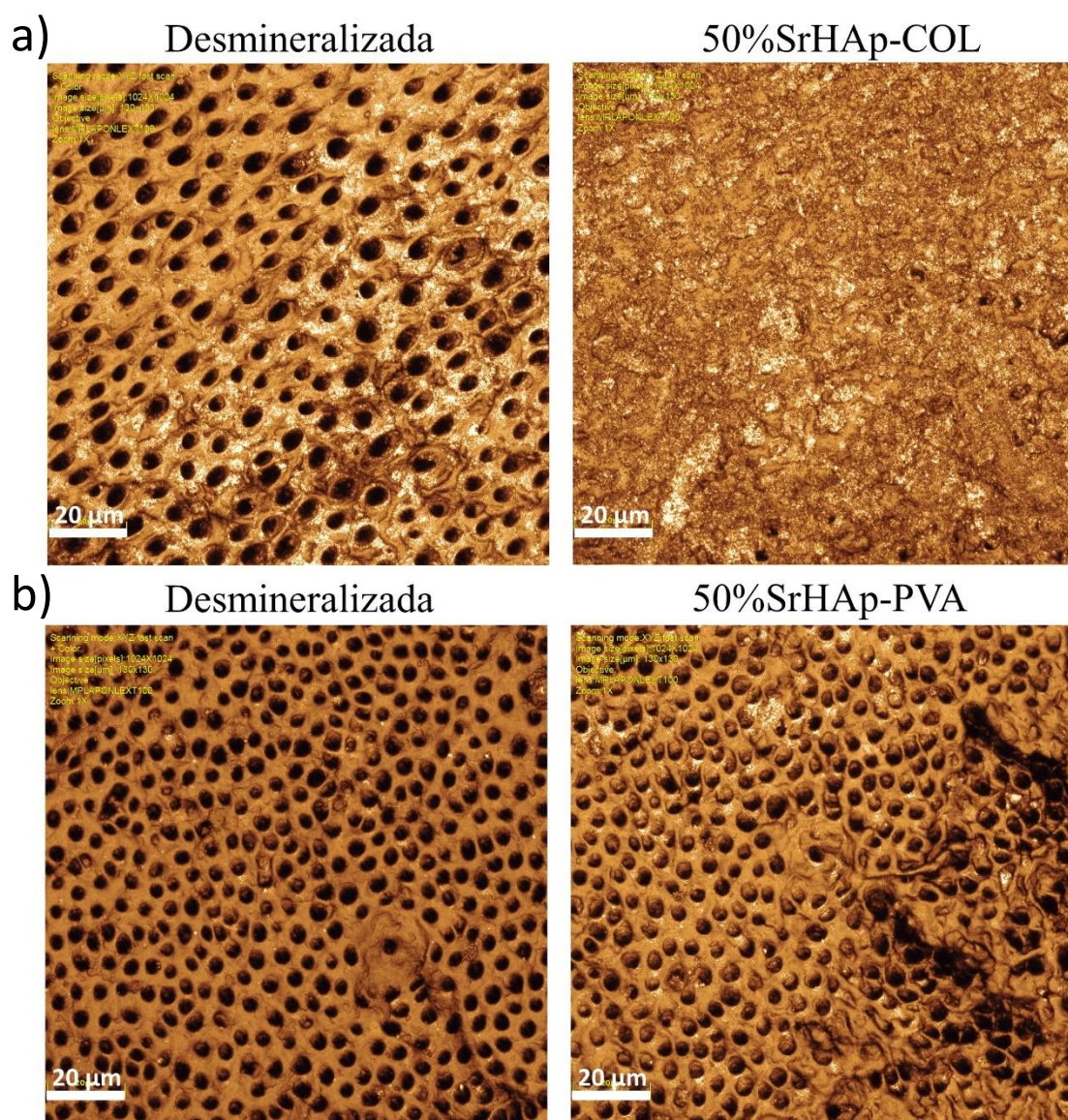
**Figura 36:** Imagens obtidas por microscopia confocal de regiões de discos de dentina desmineralizados e após o tratamento feito com 10%SrHAp-COL (a) e 10%SrHAp-PVA (b). As imagens foram obtidas de regiões próximas para verificar a variação na morfologia tubular.



**Tabela 8.** Número e área média ( $\mu\text{m}^2$ ) dos túbulos de uma região em uma área de  $130 \times 130 \mu\text{m}^2$  da superfície dentinária antes e após o tratamento com 10%SrHAp-COL e 10%SrHAp-PVA.

Discos	10%SrHAp-COL		10%SrHAp-PVA	
	Túbulos	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Túbulos	Área ( $\mu\text{m}^2$ )
Desmineralizados	444	$9,25^a \pm 5,26$	256	$9,77^a \pm 2,98$
Tratados	32	$2,79^a \pm 1,16$	253	$9,42^a \pm 2,77$

\*Letras indicam comparação nos grupos de COL1 e PVA. Mesma letra indica similaridade estatística.

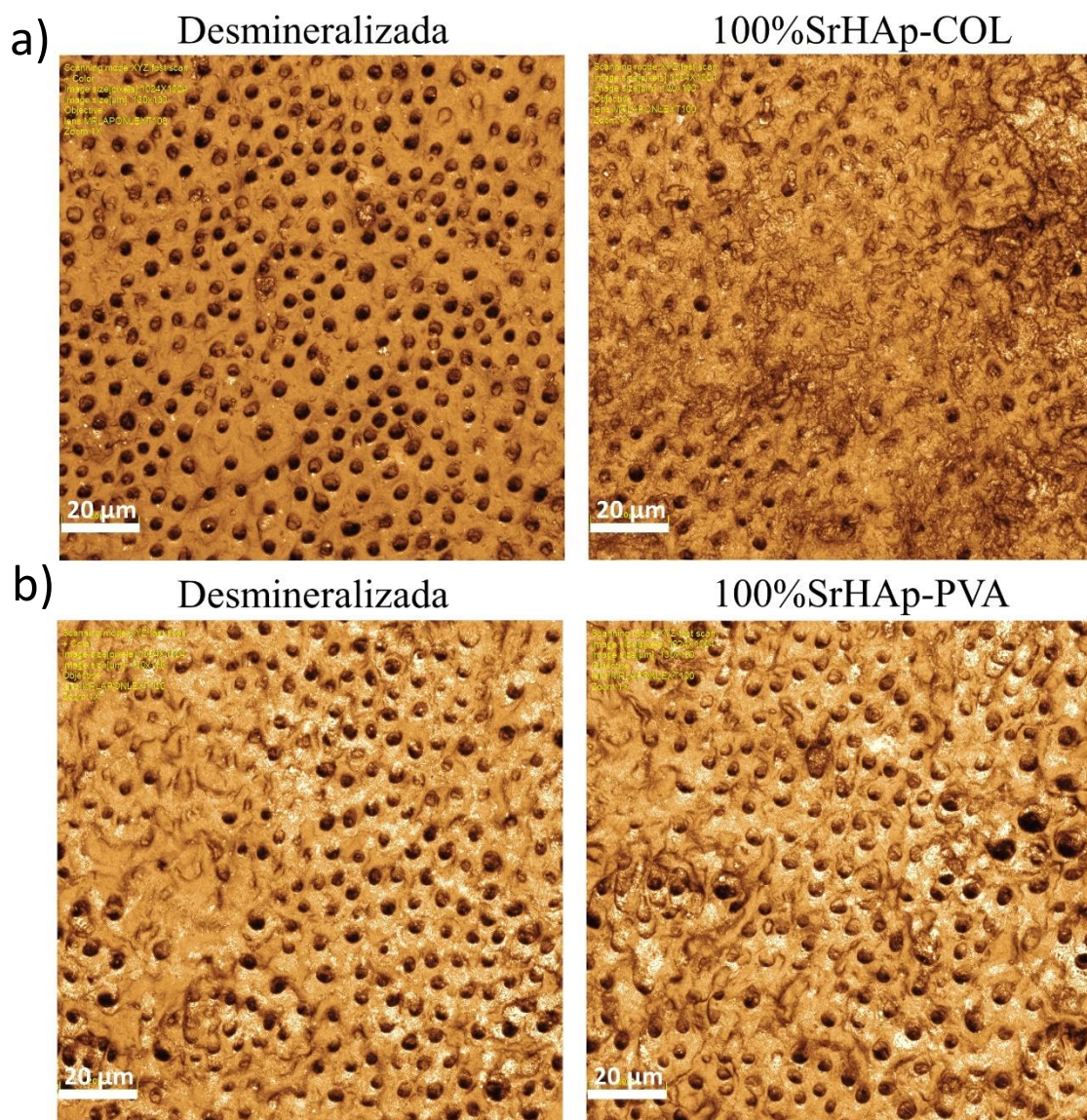


**Figura 37:** Imagens obtidas por microscopia confocal de regiões de discos de dentina desmineralizados e após o tratamento feito com 50%SrHAp-COL (a) e 50%SrHAp-PVA (b). As imagens foram obtidas de regiões próximas para verificar a variação na morfologia tubular.

**Tabela 9.** Número e área média ( $\mu\text{m}^2$ ) dos túbulos de uma região em uma área de  $130 \times 130 \mu\text{m}^2$  da superfície dentinária antes e após o tratamento com 50%SrHAp-COL e 50%SrHAp-PVA.

Discos	50%SrHAp-COL		50%SrHAp-PVA	
	Túbulos	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Túbulos	Área ( $\mu\text{m}^2$ )
Desmineralizados	214	$10,76^a \pm 4,50$	458	$6,30^a \pm 2,48$
Tratados	12	$4,34^a \pm 1,89$	423	$8,66^a \pm 6,42$

\*Letras indicam comparação nos grupos de COL1 e PVA. Mesma letra indica similaridade estatística.



**Figura 38:** Imagens obtidas por microscopia confocal de regiões de discos de dentina desmineralizados e após o tratamento feito com 100%SrHAp-COL (a) e 100%SrHAp-PVA (b). As imagens foram obtidas de regiões próximas para verificar a variação na morfologia tubular.

**Tabela 10.** Número e área média ( $\mu\text{m}^2$ ) dos túbulos de uma região em uma área de  $130 \times 130 \mu\text{m}^2$  da superfície dentinária antes a após o tratamento com 100%SrHAp-COL e 100%SrHAp-PVA.

Discos	100%SrHAp-COL		100%SrHAp-PVA	
	Túbulos	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Túbulos	Área ( $\mu\text{m}^2$ )
Desmineralizados	348	$7,99^a \pm 2,88$	206	$4,95^a \pm 2,73$
Tratados	31	$3,45^a \pm 1,63$	172	$4,83^a \pm 3,87$

\*Letras indicam comparação nos grupos de COL1 e PVA. Mesma letra indica similaridade estatística.

Modificações de permeabilidade foram verificadas para cada amostra a partir de variações percentuais de valores de condutância hidráulica da dentina antes a após os tratamentos<sup>106</sup>. A técnica utilizada busca mimetizar a pressão pulpar sobre as superfícies buscando verificar a eficiência dos tratamentos. A oclusão dos túbulos não necessariamente acarreta diminuição da permeabilidade, já que as interações entre os depósitos e a superfície do interior dos túbulos podem não ser suficiente fortes para resistir à pressão exercida pelos fluidos tissulares<sup>105</sup>. A permeabilidade máxima da dentina corresponde ao valor obtido para a dentina desmineralizada com EDTA 17%, e a permeabilidade mínima corresponde ao valor obtido para dentina sadia, ou seja, sem nenhum tratamento desmineralizante.

A tabela 11 mostra a variação percentual da condutividade hidráulica antes (utilizando como controle o disco de dentina mineralizado) e após os tratamentos com as NPs aplicados na dentina desmineralizada com EDTA 17%. Os valores negativos indicam que a permeabilidade foi diminuída com relação ao controle. Desta forma, nota-se que aplicações de 0%SrHAp-COL, 10%SrHAp-COL e 100%SrHAp-COL promoveram restauração da condutividade hidráulica para níveis similares ao controle mineralizados, devido a sua alta obliteração tubular, mostrando resistividade da camada superficial frente as pressões pulpares. O tratamento de 50%SrHAp-COL foi o mais promissor indicando variação percentual significativa de condutância hidráulica inferior ao próprio controle mineralizado. A permeabilidade das amostras tratadas com NPs-PVA aumentou após os tratamentos. Este resultado pode ser atribuído à não-obliteração tubular e baixa resistência dos depósitos ao desafio ácido, estando em concordância com os resultados verificados por microscopia confocal, indicando mais uma vez o tratamento das superfícies com 50%SrHAp-COL como o mais efetivo.

**Tabela 11.** Porcentagens de permeabilidade dentinária após cada tratamento a partir da condutância hidráulica mínima (dentina mineralizada)

NPs	Permeabilidade (%)	
	COL	PVA
0% Sr <sup>2+</sup>	-1,10 <sup>aA</sup>	111,67 <sup>aC</sup>
10% Sr <sup>2+</sup>	-1,05 <sup>aA</sup>	110,32 <sup>aC</sup>
50% Sr <sup>2+</sup>	-51,84 <sup>bB</sup>	99,07 <sup>aC</sup>
100% Sr <sup>2+</sup>	1,70 <sup>aA</sup>	112,35 <sup>aC</sup>

\*Valores negativos indicam a diminuição da permeabilidade dentinária. Letras minúsculas indicam comparação nos grupos. Letras maiúsculas indicam comparação entre todos os tratamentos. Mesma letra indica similaridade estatística.

#### 4.4 MICRODUREZA KNOOP

Análises de microdureza buscaram verificar variações de resistência mecânica das amostras de dentina antes e após os tratamentos contendo as NPs com PVA e COL1. A microdureza é definida a partir da deformação da superfície quando submetida a uma carga por um endentador e o cálculo da dureza é obtido pela razão entre a força aplicada e a área deformada<sup>107</sup>. Neste trabalho foi verificada a dureza Knoop que tem sido utilizada para investigar modificações nas superfícies dentinárias, uma vez que seu modelo de endentação permite medidas precisas já que o endentador possui uma diagonal longa e, portanto, melhor precisão nos cálculos<sup>108</sup>. Os resultados (tabela 12) indicam diferença significativa entre os controles mineralizados e desmineralizados, com a diminuição da dureza após a retirada da fase inorgânica<sup>109</sup>. Entretanto, após os tratamentos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre a microdureza do controle desmineralizado e os tratamentos.

Ebadifar et al. investigaram o efeito de creme dental contendo 7% de NPs de HAp na microdureza da dentina com lesões cariosas artificiais. Seus resultados mostraram que a dureza teve queda considerável após a exposição ácida que simulava a ação cariogênica, e após o tratamento com sucessivas aplicações do dentifício contendo NPs de HAp a microdureza aumentava, indicando assim a remineralização devido incorporação nas nanoestruturas. Entretanto, deve-se levar em consideração que as aplicações não eram intercaladas a uma série de desafios ácidos, dessa forma não simulando as sucessivas variações de pH que os dentes naturalmente estão sujeitos<sup>110</sup>. Em outro estudo, Lin et al. buscaram verificar a aplicação de NPs de HAp funcionalizada por dendrímero sobre a obliteração e resistência mecânica dentinária. Em seus resultados, as medidas de microdureza indicaram aumento estatisticamente significativo em relação ao controle na ausência de tratamento, mostrando eficácia de incorporação das nanopartículas na matriz orgânica dentinária. Deve-se levar em consideração

a não utilização de desafios ácidos no estudo referido, o que leva a considerar a não-durabilidade deste tratamento<sup>111</sup>.

Os resultados de microdureza após os tratamentos, são um indício que as nanopartículas depositadas na superfície dentinária, apesar de recobrirem os túbulos, como no caso das carregadas por COL1, não interferiram na resistência mecânica do tecido dentinário. Pode-se considerar que a interação entre as NPs (carregadas por PVA ou COL1) e o COL1 exposto nas superfícies dentinárias pelo processo de desmineralização não interagiram de forma a obter a organização hierárquica nativa de fase orgânica e inorgânica do tecido ósseo/dentinário responsável pela resistência mecânica. Por esse resultado, os tratamentos com as NPs a não indica efetividade de remineralização para uma condição nativa que proporcione resistividade mecânica.

**Tabela 12.** Valores médios e desvios padrão da microdureza Knoop dos controles e dos tratamentos contendo COL1 e PVA nas superfícies dentinárias.

<b>Tratamentos</b>	<b>Microdureza Knoop (KH)</b>
<b>Controle mineralizado</b>	23,63 <sup>a</sup> ± 1,74
<b>Controle desmineralizado</b>	12,85 <sup>b</sup> ± 2,13
<b>0%SrHAp-COL</b>	15,33 <sup>b</sup> ± 3,02
<b>10%SrHAp-COL</b>	13,23 <sup>b</sup> ± 1,86
<b>50%SrHAp-COL</b>	15,23 <sup>b</sup> ± 1,31
<b>100%SrHAp-COL</b>	14,68 <sup>b</sup> ± 1,82
<b>0%SrHAp-PVA</b>	13,18 <sup>b</sup> ± 2,80
<b>10%SrHAp-PVA</b>	10,36 <sup>b</sup> ± 1,08
<b>50%SrHAp-PVA</b>	12,18 <sup>b</sup> ± 2,56
<b>100%SrHAp-PVA</b>	10,25 <sup>b</sup> ± 1,84

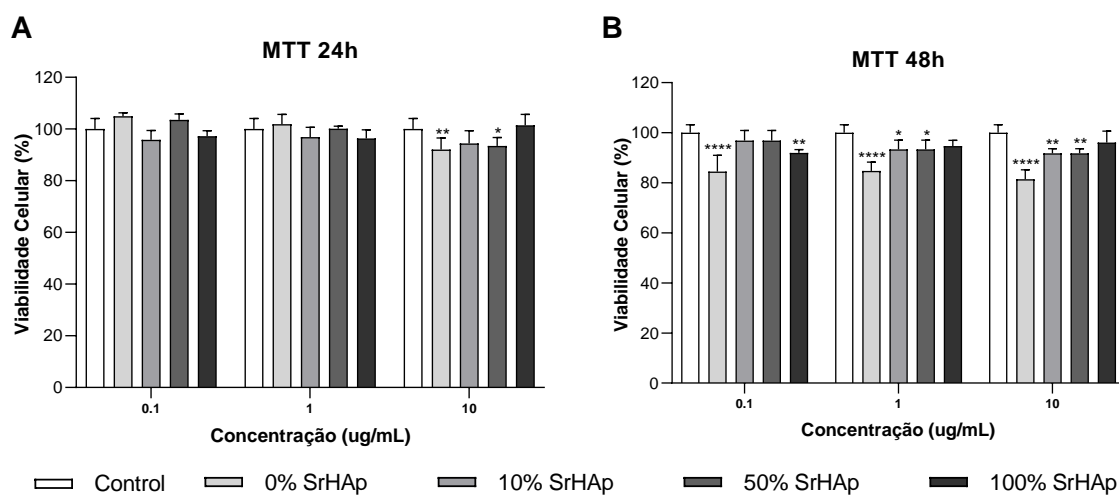
\*Letras indicam comparação entre todos os tratamentos. Mesma letra indica similaridade estatística.

#### 4.5 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS EM CULTURA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE POLPA DENTÁRIA HUMANA (hDPSCs)

##### 4.5.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Além da caracterização físico-química da superfície dentinária após os tratamentos com as NPs, devemos também considerar o possível efeito sobre células que compõe a estrutura dentária, em especial as células presentes no complexo dentina-polpa. A Figura 39 mostra que

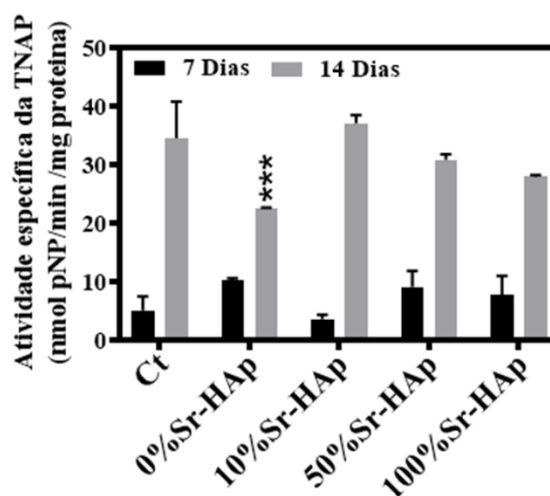
as NPs não afetaram a viabilidade celular ou a reduziram em cerca de 7,5% a 18,5% ( $p < 0,05$ ), sendo que a maior redução ocorreu no grupo 0%SrHAp, na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Após 48 h de exposição, os grupos contendo  $\text{Sr}^{2+}$ , nas diferentes porcentagens, apresentaram maior viabilidade que o 0%SrHAp ( $p < 0,05$ ), porém inferior ou equivalente ao controle. A não variação da viabilidade celular já foi reportada na literatura para nanopartículas de HAp puras de dimensões nanométricas com 20 a 70 nm no período de 24 horas quando aplicadas em cultura de células de odontoblastos MDPC-23<sup>112</sup>. O estudo de Li et al também verificou a resposta na viabilidade celular quando nanopartículas de HAp aplicadas de 1 a 7 dias na linhagem de osteoblastos MC3T3-E1, não alterando a viabilidade celular em concentrações das NPs de até 80  $\mu\text{g/mL}$ <sup>113</sup>, contradizendo o resultado encontrado neste projeto que mostrou uma diminuição significativamente estatística para NPs de 0%SrHAp após 48h de contato com o meio celular e após 24h na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Considerando ainda a possibilidade de interferência do  $\text{Sr}^{2+}$  na viabilidade celular, foi reportado na literatura que baixas concentrações de  $\text{Sr}^{2+}$  (até 5 mM) aumentam a proliferação de hDPSCs, enquanto valores superiores inibem a proliferação (10 mM)<sup>114</sup>. Outro estudo verificou via MTT em cultura de osteoblastos primários de rato a aplicação de NPs de HAp com incorporação de  $\text{Sr}^{2+}$  em porcentagens de 0%, 1%, 5% e 10%, durante 2, 4 e 6 dias e com liberação de  $\text{Sr}^{2+}$  no meio em concentrações de 0,2g/ml. O resultado indicou que até os 6 dias não houve variação na proliferação celular<sup>79</sup>.



**Figura 39.** Viabilidade de hDPSCs, avaliada pelo ensaio MTT, após 24 (A) e 48 horas (B) de exposição as NPs de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp. O controle corresponde a células sem tratamento. Os resultados representam média  $\pm$  SD dos valores de um experimento realizado em quintuplicata. Comparações estatísticas múltiplas foram realizadas por ANOVA de duas vias e teste de Tukey em relação ao controle, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

#### 4.5.2 ATIVIDADE ESPECÍFICA DA TNAP

Buscando investigar se as nanopartículas podem interferir no processo de mineralização *in vitro*, foram realizados testes de atividade de uma proteína presente nas vesículas da matriz relacionada a homeostase de fosfato, a fosfatase alcalina não-específica tecidual (TNAP) (Figura 40). Esta é uma enzima, isoforma de ALP, que possui atividade fosfomonohidrolítica, sendo assim, sua função é relacionada a formação de fosfato inorgânico (Pi), um promotor de mineralização, por meio da hidrólise de substratos fosforilados, sendo exemplos o difosfato de adenosina (ADP), o trifosfato de adenosina (ATP), glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, entre outros<sup>115,116</sup>. A literatura aponta que a maior atividade da TNAP ocorre no 14º dia de cultura, enquanto sua transcrição já é ativa em menos de sete dias, sendo assim, foram investigadas atividade no período de 7 e 14 dias considerando desde a sua transcrição bem como no seu período de maior atividade<sup>117,118</sup>.



**Figura 40.** Atividade da TNAP nos períodos 7 dias (preto) e 14 dias (cinza) de tratamento com 10 µg/mL de Nps de HAp com 0, 10, 50 e 100% de Sr<sup>2+</sup> incorporados. O controle (Ct) refere-se as células em placa de cultura. (\*\*\*) mostra a diferença estatística em relação ao controle, onde  $p < 0,0005$ ).

Os resultados obtidos (Figura 40) indicam que em 7 dias a atividade específica não variou significativamente frente ao tratamento com as NPs, em comparação ao controle. Após 14 dias, os tratamentos com as NPs de 10%SrHAp, 50%SrHAp, 100%SrHAp não mostraram diferença em relação ao controle, indicando que as NPs não aumentaram a atividade da enzima. Por outro lado, as NPs de 0%SrHAp causaram diminuição significativamente estatística de atividade da TNAP. As NPs de 0%SrHAp liberam maiores concentrações de Ca<sup>2+</sup> tornando o

meio muito mais concentrado deste íon. A literatura mostra que altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  prejudicam a resposta celular de osteoblastos, sendo que altas concentrações podem ainda ser citotóxicas<sup>119</sup>, em concordância com os resultados obtidos nas análises de MTT. Sabe-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  é um íon relacionado em diferentes vias de sinalização do metabolismo ósseo, e que a enzima de fosfatase alcalina é inibida em altas concentrações deste íon<sup>120</sup>, o que explica a diminuição de atividade somente para as NPs que contém maior quantidade de cálcio inserida. Entretanto deve-se considerar que a atividade é apenas diminuída e não inutilizada.

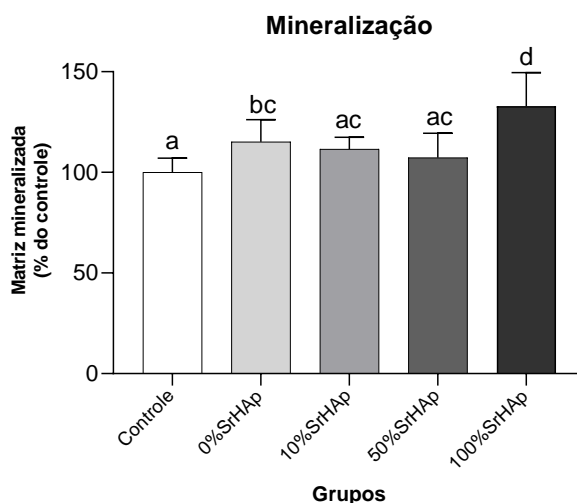
Considerando a presença do estrôncio, Bonnelye et al identificaram uma elevação da expressão do gene da TNAP, bem como o aumento da atividade TNAP quando a cultura de células era submetida a ranelato de estrôncio em concentrações de 0,1 a 1 mM de  $\text{Sr}^{2+}$ <sup>121</sup>. Nosso grupo também constatou o aumento da atividade de TNAP em cultura de osteoblastos quando cultivadas em contato com superfícies de titânio revestidas por  $\text{SrCO}_3$  buscando otimizar a interface osso-implante<sup>122</sup>. Deve-se então levar em consideração fatores além da presença do estrôncio, já que a forma de carregamento nos estudos citados é diferente, bem como o tipo de NP em comparação aos cristais de HAp que contém os íons  $\text{Sr}^{2+}$ . Além disso fatores como a concentração de  $\text{Sr}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  disponíveis são relevantes para a variação da atividade da TNAP.

#### 4.5.3 FORMAÇÃO DE NÓDULOS MINERALIZADOS

A Figura 41 traz a quantificação de formação de nódulos minerais, por meio de ensaios com vermelho de alizarina, para células tratadas com 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NPs. As células tratadas com 100%SrHAp resultaram na maior formação de nódulos mineralizados em comparação aos demais grupos experimentais e controle ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos feitos com 0%SrHAp, 10%SrHAp e 50%SrHAp promoveram a formação de nódulos mineralizantes estatisticamente equivalente entre si, porém, ao comparar estes três grupos ao controle, somente o 0%SrHAp foi estatisticamente superior no favorecimento da mineralização em relação ao controle. O aumento da mineralização *in vitro* devido a presença de hidroxiapatita já foi verificada na literatura quando investigada por Asghari et al. Este estudo que teve como objetivo projetar scaffolds nanofibrosos constituídos de poli (L-ácido láctico) (PLLA) e policaprolactona (PCL) carregando hidroxiapatitas para induzir a diferenciação odontogênica e osteogênica de hDPSCs *in vitro*. A cultura de células foi tratada por 14 dias com fibras contendo HAp e ausentes destas, resultando em maior taxa de formação de nódulos mineralizantes para as que foram tratadas com presença de HAp, quando comparada ao controle (apenas meio de cultura) e aos scaffolds contendo



somente as fibras<sup>123</sup>. A presença do  $\text{Sr}^{2+}$  como um fator de aumento de mineralização foi investigada por Abdalla et al em seu trabalho com o objetivo de obter biocerâmicas de silicato de cálcio e estrôncio (CSR) e verificar seu efeito estimulador da diferenciação e mineralização de hDPSC. Os resultados mostraram que o silicato contendo  $\text{Sr}^{2+}$  promoveu uma formação de nódulos mineralizados superior as cerâmicas contendo somente cálcio durante 14 dias de tratamento<sup>124</sup>. Considerando as NPs de HAp com o a maior quantidade de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado, e seus potenciais relacionados a formação de nódulos mineralizantes, torna-se justificável o maior grau de mineralização voltado ao tratamento com NPs de 100%SrHAp.

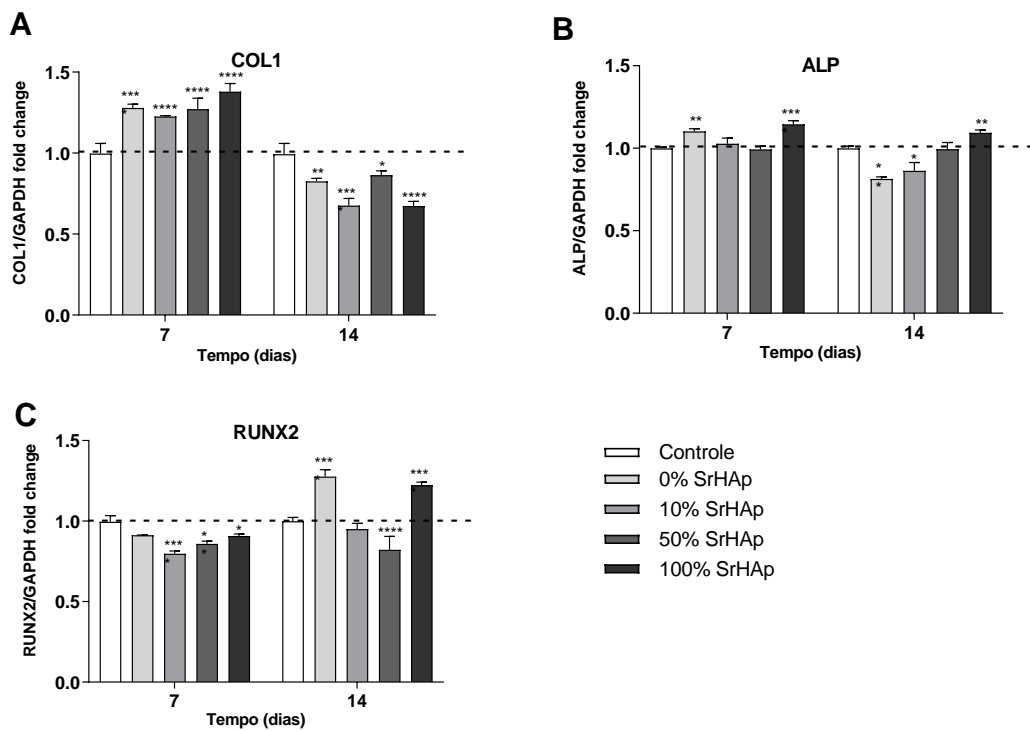


**Figure 41.** Formação de nódulos mineralizados, avaliada pelo ensaio de coloração com vermelho de alizarina, aos 14 dias de tratamento com os materiais na concentração de  $1\mu\text{g/mL}$ . O controle corresponde a hDPSCs em placa de cultura não expostas aos materiais. Os resultados representam média  $\pm$  SD dos valores de um experimento realizado em quadruplicata, os quais foram analisados por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Barras com letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

#### 4.5.4 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS EM MARCADORES OSTEOGÊNICOS

A capacidade de diferenciação osteogênica das células da polpa dental humana foi avaliada por reação em cadeia polimerase em tempo real (qPCR) para os marcadores osteogênicos de fosfatase alcalina (ALP), colágeno tipo I (COL1) e fator de transcrição relacionado a Runx2, durante 7 e 14 dias. Todos os fatores foram normalizados para o gene de manutenção do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Figura 42).

Observando os resultados do marcador de ALP (Figura 42.b) nota-se que para 7 dias a maior expressão foi para o grupo de 100%SrHAp em relação ao controle ( $p<0,0001$ ). Outro grupo nestes 7 dias que teve expressão significativa foi o de 0%SrHAp em relação ao controle ( $p<0,01$ ), porém inferior em comparação ao grupo 100%SrHAp. Tanto as nanopartículas de 10%SrHAp quanto as de 50%SrHAp não interferiram na expressão durante o mesmo intervalo de tempo. Durante 14 dias de exposição da cultura de células com as NPs, o grupo de 100%SrHAp foi o que resultou em maior expressão comparado ao controle ( $p<0,01$ ). O grupo com 50%SrHAp permaneceu sem interferir na expressão do marcador ALP. Em relação ao controle, o grupo 0%SrHAp resultou em diminuição na expressão ( $p<0,01$ ), bem como o grupo de 10%SrHAp ( $p<0,05$ ) considerando 14 dias de exposição.



**Figura 42.** Expressão gênica de marcadores osteogênicos COL1 (A), ALP (B), RUNX2 (C) em hDPSCs expostas as NPs de 0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp, na concentração de 1 $\mu$ g/mL, por 7 e 14 dias e não expostas (controle). Comparações estatísticas múltiplas foram realizadas por ANOVA de duas vias e teste de Tukey em relação ao controle; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

A literatura aponta aumento da atividade ALP após 14 dias de aplicação de nanopartículas de estrôncio apatita em osteoblastos de linhagem MC3T3-E1 sob concentrações

de NPs de 40 µg/ml<sup>113</sup>, corroborando o resultado verificado na figura 42.b. Entretanto o mesmo estudo mostrou que após 14 dias a atividade ALP para NPs de HAp aumenta<sup>113</sup>, diferente do resultado obtido neste projeto para as NPs de 0%SrHAp em células de hPDSCs que teve atividade ALP diminuída após 14 dias. Outro estudo evidenciou que em cultura de células DPSCs durante 14 dias, quando tratadas com NPs de HAp com dimensões de 25 a 30 nm incorporadas em quitosana/gelatina, elevando também a expressão do marcador ALP em 14 dias<sup>125</sup>.

Resultados para o marcador de colágeno tipo I (COL1) (Figura 42.a) mostram que após 7 dias os quatro tipos de NPs aumentaram a atividade de COL1 em comparação ao controle. Após 14 dias, para todas as NPs houve a diminuição significativamente estatística a atividade de COL1. Um trabalho utilizou NPs de HAp contidas em cimento de ionômero de vidro, e demonstrou maior expressão de COL1 em dez dias de aplicação em cultura de DPSCs, e sua subsequente diminuição em 14 dias corroborando aos resultados obtidos neste trabalho<sup>126</sup>.

A expressão de Runx2 (Figura 42.c) foi diminuída após 7 dias para as NPs de 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp, enquanto para as NPs de 0%SrHAp não houve variação em relação ao controle. Após 14 dias, houve um aumento significativo da expressão de Runx2 para as NPs de 0%SrHAp e 100%SrHAp em comparação ao controle. O tratamento com 10%SrHAp não variou em relação ao controle nos 14 dias, enquanto as NPs de 50%SrHAp causaram uma diminuição significativa em relação ao controle. Na literatura, um estudo evidenciou o aumento da expressão de Runx2 em cultura de células DPSCs durante 14 dias de cultura quando tratadas com nano-hidroxiapatitas de 25 a 30 nm incorporadas em quitosana/gelatina<sup>125</sup>. Outro estudo investigando a ação de NPs de HAp pura e com incorporação de Sr<sup>2+</sup> em cultura de osteoblastos MC3T3-E1, verificou que a expressão de Runx2 após 14 dias aumentou para as culturas tratadas com HAp contendo 10% de Sr<sup>2+</sup> incorporado, enquanto a expressão de Runx2 não teve alteração para o tratamento com HAp pura em relação ao controle utilizado, ambos na concentração de 40 µg/ml de NPs<sup>113</sup>.

A presença de Sr<sup>2+</sup> nas NPs não foi citotóxica nem inativou a atividade da TNAP, bem como as maiores concentrações (100%SrHAp) resultaram em aumento da formação de nódulos mineralizados. Esses resultados indicam a viabilidade de aplicação das NPs contendo os diferentes níveis de Sr<sup>2+</sup> em células da polpa dentária. Considerando ainda o impacto das NPs em relação aos marcadores osteogênicos, os resultados indicaram que as NPs induziram a

diferenciação osteogênica, sendo um bom resultado considerando a presença de células tronco mesenquimais nas hDPSCs.

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível a obtenção de NPs de HAp com diferentes porcentagens de  $\text{Sr}^{2+}$  incorporado pelo método de síntese de co-precipitação. As caracterizações comprovaram a viabilidade do método constatando a formação da estrutura cristalina característica da HAp, bem como a incorporação do  $\text{Sr}^{2+}$ , uma vez que sua presença interferiu a rede cristalina modificando propriedades como solubilidade, carga de superfície e morfologia. O método de síntese ainda possibilitou que as NPs obtidas fossem de ordem nanométrica, sendo este um fator importante pensando na entrada dessas estruturas nos túbulos dentinários que possuem ordem de grandeza na escala dos micrômetros, além de que, o fato das partículas serem nanométricas significa terem maior área superficial capaz de interagir com os componentes da matriz dentinária. Para os tratamentos feitos sobre as superfícies dentinárias, foi escolhida as NPs sem tratamento térmico visto sua maior solubilidade e, portanto, maior possibilidade de liberação de íons durante o tempo de tratamento.

O carregamento das NPs com COL1 mostrou-se eficaz devido a formação de um gel contendo os agregados das NPs e manutenção das fibrilas de colágeno, indicando que a estrutura das moléculas de tropocolágeno foram mantidas a ponto de formarem as fibrilas, portanto mantendo as características supramoleculares deste biopolímero. Esta conformação do colágeno é a mesma encontrada nas matrizes ósseas e dentinárias, portanto, o gel NPs + COL1 consiste em um tratamento em que o carreador é o maior componente orgânico do próprio tecido ósseo e dentinário, sendo este um aspecto considerável em termos de biocompatibilidade.

Objetivando o tratamento da hipersensibilidade dentinária, as séries de tratamentos deveriam ser realizadas sobre o tecido dentinário característico desta condição, portanto, uma das etapas deste trabalho foi dedicada a obtenção de superfícies dentinárias com túbulos dentinários expostos e alargados, além de deficientes de fase mineral. Os resultados mostraram que foi possível obter o tecido dentinário e níveis mais elevados de desmineralização e em níveis mais brandos. A caracterização físico-química mostrou que o desbalanceamento entre a fase mineral e orgânica do tecido dentinário modifica não só a abertura do túbulo, mas também a diminuição de energia livre de superfície. Essa variação é um desafio na área da odontologia, sendo muitos os tratamentos já propostos e ainda investigados para elevar a energia livre

visando melhor adesão de resinas e demais materiais com propósitos diversos em tratamentos odontológicos.

A primeira série de tratamento sobre superfície mineralizadas e brandamente desmineralizadas constataram que o polímero carreador foi um diferencial frente aos tratamentos com HAp pura, sendo que as carreadas por PVA não resistiam tão intensamente ao desafio ácido e, portanto, tiveram os túbulos alargados e mais expostos. Quando foram aplicadas as NPs de 10%SrHAp, tanto as carreadas por COL1 quanto as carreadas por PVA conseguiram barrar o ataque ácido devido a sua maior adesão superficial e, portanto, indicando a presença do  $Sr^{2+}$  como um diferencial.

Na sequência de tratamento o objetivo foi verificar as variações química e morfológicas com todas as NPs (0%SrHAp, 10%SrHAp, 50%SrHAp e 100%SrHAp) aplicadas sobre superfícies altamente desmineralizadas. As aplicações das NPs contendo COL1 restauraram o perfil químico das superfícies desmineralizadas para todas as NPs como visto nos espectros de infravermelho e nos mapas elementares, tornando presente a fase mineral constituída então das NPs sintetizadas. Constatou-se também a presença de uma rede de COL1 que recobria os túbulos indicando que a estrutura do COL1 foi um diferencial para esse tratamento. Essa modificação e manutenção das NPs sobre as superfícies modificou a energia livre tornando-a maior e, portanto, característica de um tecido mineralizado. Esse é um resultado interessante de ser considerado não somente para HD, porém para outros tratamentos que visam o aumento dessa energia frente a deposição de materiais resinosos entre outros.

As aplicações com PVA nas superfícies em maior grau de desmineralização não resultaram na mesma eficiência, sendo incapaz de obliterar os túbulos. Entretanto, quanto maior a quantidade de  $Sr^{2+}$  nas NPs, notou-se um baixo nível de deposição da NPs nos túbulos, porém de maneira muito amena como visto nas imagens de MEV. Esse resultado corroborou a modificação na energia livre de superfície, uma vez que as NPs com mais  $Sr^{2+}$  causou a elevação da energia livre, comprovando que a presença do  $Sr^{2+}$  se torna um diferencial para carreadores não efetivos, uma vez que conseguem se fixar no colágeno exposto da dentina desmineralizada.

O nível de obliteração quando verificado por microscopia confocal constatou a discrepância entre os tratamentos com colágeno e PVA a partir da quantidade de túbulos obliterados após os tratamentos. Sendo muito maior para os tratamentos com colágeno e não ocorrendo para os tratamentos com PVA. Esse fator foi significativo para as medidas de permeabilidade. Considerando o mecanismo responsável pela hipersensibilidade a

movimentação do fluido tissular, uma vez impedido, inibe a sensação de dor. Os tratamentos com COL1 restauraram a permeabilidade original dos discos desmineralizados, em especial para o tratamento com as NPs de 50%SrHAp. Essa queda significativa da permeabilidade corroborou aos resultados de obliteração, portanto constando que além de obliterar, o tratamento conseguia resistir à pressão exercida do fluido tissular, indicando sua resistência a variações de pressão oriundas da câmara pulpar ou então de origem externa nos casos de exposição da dentina. Medidas de microdureza mostraram que as NPS não interagiram de forma a obter a organização hierárquica nativa de fase orgânica e inorgânica do tecido ósseo/dentinário. Portanto, os tratamentos com as NPs, independentemente do carreador, não resultaram em efetividade de remineralização para uma condição nativa que proporcione resistividade mecânica.

Considerando a possibilidade de interação das NPs com as células da polpa dentária, os testes de aplicação das nanopartículas em cultura de células tronco mesenquimais da polpa dental humana não foram citotóxicos, portanto, garantindo a manutenção da viabilidade celular. De fato, a presença das nanopartículas não interferiu na viabilidade celular em especial para as NPs contendo incorporação de estrôncio. Pensando na aplicação voltada para a restauração das características físico-químicas e obliteração do tecido dentinário, a não toxicidade das NPs é um resultado satisfatório, bem como o aumento da formação de nódulos mineralizantes e indução da diferenciação osteogênica *in vitro* devido ao tratamento com as NPs, indicando possível ação favorável quando em contato com as células da polpa dentária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HU, Meng-Long; ZHENG, Gang; ZHANG, You-Dong; YAN, Xiang; LI, Xiao-Chan; LIN, Hong. Effect of desensitizing toothpastes on dentine hypersensitivity: a systematic review and meta-analysis. *Journal Of Dentistry*, [S.L.], v. 75, p. 12-21, ago. 2018.
2. WEST, N.X.. Dentine Hypersensitivity. *Monographs In Oral Science*, [S.L.], p. 173-189, 2006.
3. CURRO, Frederick A.. Tooth Hypersensitivity in the Spectrum of Pain. **Dental Clinics Of North America**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 429-437, jul. 1990.
4. ZEOLA, Livia Favaro; SOARES, Paulo Vinícius; CUNHA-CRUZ, Joana. Prevalence of dentin hypersensitivity: systematic review and meta-analysis. *Journal Of Dentistry*, [S.L.], v. 81, p. 1-6, fev. 2019.
5. BOIKO, Olga V.; BAKER, Sarah R.; GIBSON, Barry J.; LOCKER, David; SUFI, Farzana; BARLOW, Ashley P.s.; ROBINSON, Peter G.. Construction and validation of the quality of life measure for dentine hypersensitivity (DHEQ). *Journal Of Clinical Periodontology*, [S.L.], v. 37, n. 11, p. 973-980, 22 set. 2010.
6. BEKES, Katrin; HIRSCH, Christian. What is known about the influence of dentine hypersensitivity on oral health-related quality of life? *Clinical Oral Investigations*, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 45-51, 6 dez. 2012.
7. KIM, Ji Won; PARK, Joo-Cheol. Dentin hypersensitivity and emerging concepts for treatments. *Journal Of Oral Biosciences*, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 211-217, nov. 2017.
8. GOLDBERG, Michel. Dentin structure composition and mineralization. *Frontiers In Bioscience*, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 711-735, 2011.
9. PINTO, Shelon Cristina Souza et al. Effect of desensitizing toothpastes on dentin. **Brazilian Oral Research**, v. 26, n. 5, p.410-417, out. 2012.
10. BERTASSONI, Luiz E.. Dentin on the nanoscale: hierarchical organization, mechanical behavior and bioinspired engineering. **Dental Materials**, [S.L.], v. 33, n. 6, p. 637-649, jun. 2017.
11. ARNOLD, W. H.; GRÖGER, Ch.; BIZHANG, M.; NAUMOVA, E. A.. Dentin abrasivity of various desensitizing toothpastes. *Head & Face Medicine*, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-5, 2 abr. 2016.
12. SHARMA, Vaibhav; SRINIVASAN, Alagiri; NIKOLAJEFF, Fredrik; KUMAR, Saroj. Biomineralization process in hard tissues: the interaction complexity within protein and inorganic counterparts. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 120, p. 20-37, jan. 2021.



13. BERTASSONI, L.e.; HABELITZ, S.; KINNEY, J.H.; MARSHALL, S.J.; MARSHALL JUNIOR, G.W.. Biomechanical Perspective on the Remineralization of Dentin. **Caries Research**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 70-77, 2009.
14. SHOULDERS, Matthew D.; RAINES, Ronald T.. Collagen Structure and Stability. **Annual Review Of Biochemistry**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 929-958, 1 jun. 2009.
15. ORGEL, Joseph P. R. O.; IRVING, Thomas C.; MILLER, Andrew; WESS, Tim J.. Microfibrillar structure of type I collagen in situ. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 103, n. 24, p. 9001-9005, 13 jun. 2006.
16. XU, Yifei; NUDELMAN, Fabio; EREN, E. Deniz; WIRIX, Maarten J. M.; CANTAERT, Bram; NIJHUIS, Wouter H.; HERMIDA-MERINO, Daniel; PORTALE, Giuseppe; BOMANS, Paul H. H.; OTTMANN, Christian. Intermolecular channels direct crystal orientation in mineralized collagen. **Nature Communications**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-12, 8 out. 2020.
17. SAGHIRI, Mohammad Ali; VAKHNOVETSKY, Julia; VAKHNOVETSKY, Anna; GHOBRIAL, Marina; NATH, Devyani; MORGANO, Steven M.. Functional role of inorganic trace elements in dentin apatite tissue—Part 1: mg, sr, zn, and fe. **Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology**, [S.L.], v. 71, p. 126932, maio 2022.
18. CRUZ, Marcos; FERREIRA, Claudio; NOGUEIRA, Lucas; ANDRILLI, Luiz; SANTOS, Ana; MACEDO, Jeferson; VESCHI, Ekeveliny; FAVARIN, Bruno; SEBINELLI, Heitor; BOLEAN, Mayte. ASPECTOS QUÍMICOS DA BIOMINERALIZAÇÃO ÓSSEA. **Química Nova**, [S.L.], p. 1-16, 2021.
19. DALLAS SL, BONEWALD LF. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. **Ann N Y Acad Sci** 2010;1192:437-43.
20. VITAL, S. Opsahl; GAUCHER, C.; BARDET, C.; ROWE, P.s.; GEORGE, A.; LINGLART, A.; CHAUSSAIN, C.. Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. **Bone**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 989-997, abr. 2012.
21. KATCHBURIAN, E. & ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 4ª. edição, 2017.
22. MONTOYA, C.; ARANGO-SANTANDER, S.; PELÁEZ-VARGAS, A.; AROLA, D.; OSSA, E.A.. Effect of aging on the microstructure, hardness and chemical composition of dentin. **Archives Of Oral Biology**, [S.L.], v. 60, n. 12, p. 1811-1820, dez. 2015.
23. DELFINO, C. S.; RIBEIRO, C.; VIEIRA, G. F.; BRESSIANI, A. H. A.; TURBINO, M. L.. Uso de novos materiais para o capeamento pulpar (hidroxiapatita - HAp e fosfato tricálcico -  $\beta$ -TCP). **Cerâmica**, [S.L.], v. 56, n. 340, p. 381-388, dez. 2010.
24. ISHIHATA, Hiroshi; KANEHIRA, Masafumi; FINGER, Werner J.; TAKAHASHI, Hidekazu; TOMITA, Makoto; SASAKI, Keiichi. Effect of two desensitizing agents on dentin permeability in vitro. **Journal Of Applied Oral Science**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 34-41, fev. 2017.

25. ZHAO, Y.; YUAN, X.; LIU, B.; TULU, U.s.; HELMS, J.A.. Wnt-Responsive Odontoblasts Secrete New Dentin after Superficial Tooth Injury. **Journal Of Dental Research**, [S.L.], v. 97, n. 9, p. 1047-1054, 22 mar. 2018.
26. BARTOLD, Pm. Dentinal hypersensitivity: a review. **Australian Dental Journal**, [S.L.], v. 51, n. 3, p. 212-218, set. 2006.
27. KARIM, Ikhlas A. El; LINDEN, Gerard J.; CURTIS, Timothy M.; ABOUT, Imad; MCGAHON, Mary K.; IRWIN, Chris R.; LUNDY, Fionnuala T.. **Human odontoblasts express functional thermo-sensitive TRP channels: implications for dentin sensitivity**. *Pain*, [S.L.], v. 152, n. 10, p. 2211-2223, out. 2011.
28. MAGLOIRE, Henry; COUBLE, Marie-Lise; THIVICHON-PRINCE, Beatrice; MAURIN, Jean-Christophe; BLEICHER, Françoise. Odontoblast: a mechano-sensory cell. **Journal Of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, [S.L.], v. 312, n. 5, p. 416-424, 15 jul. 2009.
29. MIGLANI, Sanjay; AGGARWAL, Vivek; AHUJA, Bhoomika. Dentin hypersensitivity: recent trends in management. **Journal Of Conservative Dentistry**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 218, 2010.
30. DAVARI A, ATAEI E, ASSARZADEH H. Dentin hypersensitivity: etiology, diagnosis and treatment; a literature review. **J Dent (Shiraz)**, [S.L.],v.14 p 136-145., 2013.
31. ADDY, M.; WEST, N.X.. The Role of Toothpaste in the Aetiology and Treatment of Dentine Hypersensitivity. **Monographs In Oral Science**, [S.L.], p. 75-87, 2013.
32. WEST, Nicola X.; SEONG, Joon; DAVIES, Maria. Management of dentine hypersensitivity: efficacy of professionally and self-administered agents. **Journal Of Clinical Periodontology**, [S.L.], v. 42, p. 256-302, 31 mar. 2015.
33. ARNOLD, W.H.; PRANGE, M.; NAUMOVA, E.A.. Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 440-449, abr. 2015.
34. LOVE, R. M.. The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. **Oral Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 32-37, fev. 2002.
35. BYERS M, NARHI M. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. **Crit Rev Oral Biol Med** 1999;10:4–39.
36. BAE, Ji-Hyun; KIM, Young-Kyun; MYUNG, Seung-Kwon. Desensitizing toothpaste versus placebo for dentin hypersensitivity: a systematic review and meta-analysis. **Journal Of Clinical Periodontology**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 131-141, 9 jan. 2015.
37. HU, Meng-Long; ZHENG, Gang; LIN, Hong; YANG, Meng; ZHANG, You-Dong; HAN, Jian-Min. Network meta-analysis on the effect of desensitizing toothpastes

- on dentine hypersensitivity. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 88, p. 103170, set. 2019.
38. MARTO, Carlos Miguel; PAULA, Anabela Baptista; NUNES, Tiago; PIMENTA, Miguel; ABRANTES, Ana Margarida; PIRES, Ana Salomé; LARANJO, Mafalda; COELHO, Ana; DONATO, Helena; BOTELHO, Maria Filomena. Evaluation of the efficacy of dentin hypersensitivity treatments—A systematic review and follow-up analysis. **Journal Of Oral Rehabilitation**, [S.L.], v. 46, n. 10, p. 952-990, 12 jul. 2019.
  39. SHIAU, Harlan J.. Dentin Hypersensitivity. **Journal Of Evidence Based Dental Practice**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 220-228, set. 2012.
  40. SAEKI, Kuniko; MARSHALL, Grayson W.; GANSKY, Stuart A.; PARKINSON, Charles R.; MARSHALL, Sally J.. Strontium effects on root dentin tubule occlusion and nanomechanical properties. **Dental Materials**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 240-251, fev. 2016.
  41. LIU, Min; ZHANG, Feng; WANG, Peng; MING, Jinfa; ZUO, Baoqi. Preparation and characterization of silk fibroin/strontium carbonate film through rapid formation. **Materials Letters**, [S.L.], v. 189, p. 46-49, fev. 2017.
  42. BOANINI, Elisa; TORRICELLI, Paola; GAZZANO, Massimo; DELLA BELLA, Elena; FINI, Milena; BIGI, Adriana. Combined effect of strontium and zoledronate on hydroxyapatite structure and bone cell responses. **Biomaterials**, [S.L.], v. 35, n. 21, p. 5619-5626, jul. 2014.
  43. DAI, Jiewen; FU, Yuanfei; CHEN, Demin; SUN, Zhaoyao. A novel and injectable strontium-containing hydroxyapatite bone cement for bone substitution: a systematic evaluation. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 124, p. 112052, maio 2021.
  44. HUANG, Mei; HILL, Robert G.; RAWLINSON, Simon C.F.. Strontium (Sr) elicits odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs): a therapeutic role for sr in dentine repair?. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 38, p. 201-211, jul. 2016.
  45. ALENCAR, Cristiane de Melo; PAULA, Brennda Lucy Freitas de; ORTIZ, Mariangela Ivette Guanipa; MAGNO, Marcela Baraúna; SILVA, Cecy Martins; MAIA, Lucianne Cople. Clinical efficacy of nano-hydroxyapatite in dentin hypersensitivity: a systematic review and meta-analysis. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 82, p. 11-21, mar. 2019.
  46. GEEVARGHESE, Sherin; MATHEW, Sylvia; MATHEW, Rhea. Evaluation of the effect of a remineralising paste containing strontium doped nanohydroxyapatite with Non-Collagenous protein analogue - chitosan on the characteristics of partially demineralized dentin -An invitro study. **Materials Today: Proceedings**, [S.L.], v. 46, p. 5958-5963, 2021.
  47. ZHUANG, Jia; KUO, Chun-Hong; CHOU, Lien-Yang; LIU, De-Yu; WEERAPANA, Eranthie; TSUNG, Chia-Kuang. Optimized Metal–Organic-

- Framework Nanospheres for Drug Delivery: evaluation of small-molecule encapsulation. *Acs Nano*, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 2812-2819, 14 fev. 2014.
48. FOGGIA, Michele di; PRATI, Carlo; GANDOLFI, Maria Giovanna; TADDEI, Paola. An in vitro study on dentin demineralization and remineralization: collagen rearrangements and influence on the enucleated phase. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, [S.L.], v. 193, p. 84-93, abr. 2019.
  49. MARSHALL, Grayson W.; MARSHALL, Sally J.; KINNEY, John H.; BALOOCH, Mehdi. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *Journal Of Dentistry*, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 441-458, nov. 1997.
  50. NIU, Li-Na; ZHANG, Wei; PASHLEY, David H.; BRESCHI, Lorenzo; MAO, Jing; CHEN, Ji-Hua; TAY, Franklin R.. Biomimetic remineralization of dentin. *Dental Materials*, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 77-96, jan. 2014.
  51. YANG, Wen; MEYERS, Marc A.; RITCHIE, Robert O.. Structural architectures with toughening mechanisms in Nature: a review of the materials science of type-I collagenous materials. *Progress In Materials Science*, [S.L.], v. 103, p. 425-483, jun. 2019.
  52. WANG, Zhejun; JIANG, Tao; SAURO, Salvatore; WANG, Yining; THOMPSON, Ian; WATSON, Timothy F.; SA, Yue; XING, Wenzhong; SHEN, Ya; HAAPASALO, Markus. Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes. *Journal Of Dentistry*, [S.L.], v. 39, n. 11, p. 746-756, nov. 2011.
  53. ALMEIDA, Leonardo de Pádua Andrade. **Remineralização dentinária e obliteração tubular por materiais bioinspirados em acetato de estrôncio e colágeno**. 2019. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Universidade de São, Ribeirão Preto, 2019.
  54. RAJAN, Navneeta; HABERMEHL, Jason; COTÉ, Marie-France; DOILLON, Charles J; MANTOVANI, Diego. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nature Protocols*, [S.L.], v. 1, n. 6, p. 2753-2758, dez. 2006.
  55. KOMSA-PENKOVA, Regina; SPIROVA, Rositza; BECHEV, Blagovest. Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement. *Journal Of Biochemical And Biophysical Methods*, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 33-43, abr. 1996.
  56. DOTTA, Tatiane Cristina. **Efeito de nanopartículas de carbonato de estrôncio e carbonato parcialmente substituído por estrôncio na remineralização e obliteração tubular da dentina**. 2019. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.
  57. RUDAWSKA, Anna; JACNIACKA, Elżbieta. Analysis for determining surface free energy uncertainty by the Owen–Wendt method. *International Journal Of Adhesion And Adhesives*, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 451-457, jun. 2009.

58. MANTOVANI, Carolina Paes Torres. **Análise das propriedades físicas e químicas da dentina de dentes decíduos e permanentes - estudo in vitro**. 2011. 76f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.
59. MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983.
60. FARIA, A. N. de; ZANCANELA, D. C.; RAMOS, A. P.; TORQUETI, M. R.; CIANCAGLINI, P.. Estrogen and phenol red free medium for osteoblast culture: study of the mineralization ability. **Cytotechnology**, [S.L.], v. 68, n. 4, p. 1623-1632, 30 jan. 2015.
61. SIMÃO, Ana Maria S.; BELOTI, Marcio M.; ROSA, Adalberto L.; OLIVEIRA, Paulo T. de; GRANJEIRO, José Mauro; PIZAURO, João M.; CIANCAGLINI, Pietro. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. **Cell Biology International**, [S.L.], v. 31, n. 11, p. 1405-1413, nov. 2007.
62. A GREGORY, Carl; GUNN, W Grady; PEISTER, Alexandra; PROCKOP, Darwin J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 329, n. 1, p. 77-84, jun. 2004.
63. LEGUIZAMÓN, Natalia da Ponte; RODRIGUES, Elisandra Marcia; CAMPOS, Michel Leandro de; NOGUEIRA, Andressa Vilas Boas; VIOLA, Kennia Scapin; SCHNEIDER, Vanessa Karine; NEO-JUSTINO, Daniela Morilha; TANOMARU-FILHO, Mario; ZAMBUZZI, Willian Fernando; HENRIQUE-SILVA, Flavio. In vivo and in vitro anti-inflammatory and pro-osteogenic effects of citrus cystatin CsinCPI-2. **Cytokine**, [S.L.], v. 123, p. 154760, nov. 2019.
64. O'DONNELL, M.D.; FREDHOLM, Y.; ROUFFIGNAC, A. de; HILL, R.G.. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 4, n. 5, p. 1455-1464, set. 2008.
65. LI, Z.y.; LAM, W.M.; YANG, C.; XU, B.; NI, G.X.; ABBAH, S.A.; CHEUNG, K.M.C.; LUK, K.D.K.; LU, W.W.. Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. **Biomaterials**, [S.L.], v. 28, n. 7, p. 1452-1460, mar. 2007.
66. BIGI, Adriana; BOANINI, Elisa; CAPUCCINI, Chiara; GAZZANO, Massimo. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. **Inorganica Chimica Acta**, [S.L.], v. 360, n. 3, p. 1009-1016, fev. 2007.
67. FRASNELLI, Matteo; CRISTOFARO, Francesco; SGLAVO, Vincenzo M.; DIRÈ, Sandra; CALLONE, Emanuela; CECCATO, Riccardo; BRUNI, Giovanna; CORNAGLIA, Antonia Icaro; VISAI, Livia. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 71, p. 653-662, fev. 2017.

68. TERMINE, J. D.; LUNDY, D. R.. Vibrational spectra of some phosphate salts amorphous to X-ray diffraction. **Calcified Tissue Research**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 55-70, dez. 1974.
69. KAVITHA, M.; SUBRAMANIAN, R.; NARAYANAN, R.; UDHAYABANU, V.. Solution combustion synthesis and characterization of strontium substituted hydroxyapatite nanocrystals. **Powder Technology**, [S.L.], v. 253, p. 129-137, fev. 2014.
70. TERRA, Joice; DOURADO, Erico Rodrigues; EON, Jean-Guillaume; ELLIS, Donald E.; GONZALEZ, Gabriela; ROSSI, Alexandre Malta. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. **Phys. Chem.**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 568-577, 2009.
71. DOOSTMOHAMMADI, Ali; MONSHI, Ahmad; SALEHI, Rasoul; FATHI, M.H.; KARBASI, Saeed; PIELES, Uwe; DANIELS, A.u.. Preparation, chemistry and physical properties of bone-derived hydroxyapatite particles having a negative zeta potential. **Materials Chemistry And Physics**, [S.L.], v. 132, n. 2-3, p. 446-452, fev. 2012.
72. SADAT-SHOJAI, Mehdi; ATAI, Mohammad; NODEHI, Azizollah; KHANLAR, Leila Nasiri. Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: synthesis and application. **Dental Materials**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 471-482, maio 2010.
73. PALAZZO, Barbara; WALSH, Dominic; IAFISCO, Michele; FORESTI, Elisabetta; BERTINETTI, Luca; MARTRA, Gianmario; BIANCHI, Claudia Letizia; CAPPELLETTI, Giuseppe; ROVERI, Norberto. Amino acid synergetic effect on structure, morphology and surface properties of biomimetic apatite nanocrystals. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 1241-1252, maio 2009.
74. TOMAZELA, Larissa. **Desenvolvimento, caracterização física e química e análise de propriedades osteogênicas de cimento ósseo poroso a base de PMMA contendo estrôncio**. 2020. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.
75. CHENG, K; WENG, W; WANG, H; ZHANG, S. In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings. **Biomaterials**, [S.L.], v. 26, n. 32, p. 6288-6295, nov. 2005.
76. SMEETS, R., KOLK, A., GERRESSEN, M. et al. A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation. **Head Face Med** 5, 13 (2009).
77. BAIG, Arif A.; FOX, Jeffrey L.; HSU, Jer; WANG, Zeren; OTSUKA, Makoto; HIGUCHI, William I.; LEGEROS, Racquel Z.. Effect of Carbonate Content and Crystallinity on the Metastable Equilibrium Solubility Behavior of Carbonated Apatites. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 179, n. 2, p. 608-617, maio 1996.

78. LANDI, Elena; TAMPIERI, Anna; CELOTTI, Giancarlo; SPRIO, Simone; SANDRI, Monica; LOGROSCINO, Giandomenico. Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 961-969, nov. 2007.
79. NI, Guo-Xin; YAO, Zhi-Peng; HUANG, Guo-Tao; LIU, Wen-Ge; LU, William W.. The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts in vitro. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 961-967, 2 mar. 2011.
80. HARRISON, Caroline; HATTON, Paul; GENTILE, Piergiorgio; MILLER, Cheryl. Nanoscale Strontium-Substituted Hydroxyapatite Pastes and Gels for Bone Tissue Regeneration. **Nanomaterials**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1611, 19 jun. 2021.
81. WANG, Dongbo; YE, Jing; HUDSON, Steven D.; SCOTT, Keana C.K.; LIN-GIBSON, Sheng. Effects of nanoparticle size and charge on interactions with self-assembled collagen. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 417, p. 244-249, mar. 2014. Elsevier BV.
82. LOPES, Camila de Carvalho Almança; LIMIRIO, Pedro Henrique Justino Oliveira; NOVAIS, Veridiana Resende; DECHICHI, Paula. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. **Applied Spectroscopy Reviews**, [S.L.], v. 53, n. 9, p. 747-769, 6 fev. 2018.
83. FRANCE, Christine A.M.; SUGIYAMA, Nawa; AGUAYO, Esther. Establishing a preservation index for bone, dentin, and enamel bioapatite mineral using ATR-FTIR. **Journal Of Archaeological Science: Reports**, [S.L.], v. 33, p. 102551, out. 2020.
84. TABATABAEI, Fahimeh Sadat; TATARI, Saeed; SAMADI, Ramin; TORSHABI, Maryam. Surface characterization and biological properties of regular dentin, demineralized dentin, and deproteinized dentin. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [S.L.], v. 27, n. 11, p. 1-11, 21 set. 2016.
85. SPENCER, Paulette; WANG, Yong; KATZ, J. Lawrence; MISRA, Anil. Physicochemical interactions at the dentin/adhesive interface using FTIR chemical imaging. **Journal Of Biomedical Optics**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 031104, 2005.
86. KAWASAKI, K.; RUBEN, J.; TSUDA, H.; HUYSMANS, M.C.D.N.J.M.; TAKAGI, O.. Relationship between Mineral Distributions in Dentine Lesions and Subsequent Remineralization in vitro. **Caries Research**, [S.L.], v. 34, n. 5, p. 395-403, 2000.
87. SILVA JÚNIOR, Zenildo Santos; BOTTA, Sergio Brossi; ANA, Patricia Aparecida; FRANÇA, Cristiane Miranda; FERNANDES, Kristianne Porta Santos; MESQUITA-FERRARI, Raquel Agnelli; DEANA, Alessandro; BUSSADORI, Sandra Kalil. Effect of papain-based gel on type I collagen - spectroscopy applied for microstructural analysis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-7, 23 jun. 2015.

88. RATH, Priti P.; YIU, Cynthia K.y.; MATINLINNA, Jukka P.; KISHEN, Anil; NEELAKANTAN, Prasanna. The effects of sequential and continuous chelation on dentin. **Dental Materials**, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 1655-1665, dez. 2020.
89. TADDEI, Paola; PRATI, Carlo; GANDOLFI, Maria Giovanna. A poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based resin improves the dentin remineralizing ability of calcium silicates. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 77, p. 755-764, ago. 2017.
90. GANDOLFI, Maria; TADDEI, Paola; PONDRELLI, Anna; ZAMPARINI, Fausto; PRATI, Carlo; SPAGNUOLO, Gianrico. Demineralization, Collagen Modification and Remineralization Degree of Human Dentin after EDTA and Citric Acid Treatments. **Materials**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 25, 21 dez. 2018.
91. COMBE, E. A protocol for determining the surface free energy of dental materials. **Dental Materials**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 262-268, mar. 2004.
92. OKULUS, Zuzanna; STRZEMIECKA, Beata; CZARNECKA, Beata; BUCHWALD, Tomasz; VOELKEL, Adam. Surface energy of bovine dentin and enamel by means of inverse gas chromatography. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 49, p. 382-389, abr. 2015.
93. ATTAL, Jean-Pierre; ASMUSSEN, Erik; DEGRANGE, Michel. Effects of surface treatment on the free surface energy of dentin. **Dental Materials**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 259-264, jul. 1994.
94. ROSALES, J.I.; MARSHALL, G.W.; MARSHALL, S.J.; WATANABE, L.G.; TOLEDANO, M.; CABRERIZO, M.A.; OSORIO, R.. Acid-etching and Hydration Influence on Dentin Roughness and Wettability. **Journal Of Dental Research**, [S.L.], v. 78, n. 9, p. 1554-1559, set. 1999.
95. PERDIGÃO, J.; LOPES, M.; GERALDELI, S.; LOPES, G.C.; GARCÍA-GODOY, F.. Effect of a sodium hypochlorite gel on dentin bonding. **Dental Materials**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 311-323, set. 2000.
96. SOWMYA, S.; BUMGARDENER, Joel D.; CHENNAZHI, Krishna Prasad; NAIR, Shantikumar V.; JAYAKUMAR, R.. Role of nanostructured biopolymers and bioceramics in enamel, dentin and periodontal tissue regeneration. **Progress In Polymer Science**, [S.L.], v. 38, n. 10-11, p. 1748-1772, out. 2013.
97. CHÁVEZ-ANDRADE, Gisselle M.; TANOMARU-FILHO, Mário; RODRIGUES, Elisandra M.; GOMES-CORNÉLIO, Ana Livia; FARIA, Gisele; BERNARDI, Maria Inês B.; GUERREIRO-TANOMARU, Juliane M.. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. **Archives Of Oral Biology**, [S.L.], v. 84, p. 89-93, dez. 2017.
98. POURSAMAR, S. Ali; AZAMI, Mahmoud; MOZAFARI, Masoud. Controllable synthesis and characterization of porous polyvinyl alcohol/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds via an in situ colloidal technique. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 310-316, jun. 2011.



99. OSORIO, R.; OSORIO, E.; MEDINA-CASTILLO, A.L.; TOLEDANO, M.. Polymer Nanocarriers for Dentin Adhesion. **Journal Of Dental Research**, [S.L.], v. 93, n. 12, p. 1258-1263, 16 set. 2014.
100. TAKIMOTO, Masayuki; ISHII, Ryo; IINO, Masayoshi; SHIMIZU, Yusuke; TSUJIMOTO, Akimasa; TAKAMIZAWA, Toshiki; ANDO, Susumu; MIYAZAKI, Masashi. Influence of temporary cement contamination on the surface free energy and dentine bond strength of self-adhesive cements. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 131-138, fev. 2012.
101. INOUE, Naoki; TSUJIMOTO, Akimasa; TAKIMOTO, Masayuki; OOTSUKA, Eiichiro; ENDO, Hajime; TAKAMIZAWA, Toshiki; MIYAZAKI, Masashi. Surface free-energy measurements as indicators of the bonding characteristics of single-step self-etching adhesives. **European Journal Of Oral Sciences**, [S.L.], v. 118, n. 5, p. 525-530, 10 set. 2010.
102. SHIMIZU, Y; A TSUJIMOTO,.; FURUICHI, T; SUZUKI, T; TSUBOTA, K; MIYAZAKI, M; PLATT, Ja. Influence of Light Intensity on Surface Free Energy and Dentin Bond Strength of Core Build-up Resins. **Operative Dentistry**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 87-95, 1 jan. 2015.
103. BRESCHI, Lorenzo; MARAVIC, Tatjana; CUNHA, Sandra Ribeiro; COMBA, Allegra; CADENARO, Milena; TJÄDERHANE, Leo; PASHLEY, David H.; TAY, Franklin R.; MAZZONI, Annalisa. Dentin bonding systems: from dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. **Dental Materials**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 78-96, jan. 2018.
104. SAURO, Salvatore; WATSON, Timothy F.; THOMPSON, Ian. Dentine desensitization induced by prophylactic and air-polishing procedures: an in vitro dentine permeability and confocal microscopy study. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 38, n. 5, p. 411-422, maio 2010. Elsevier BV.
105. MACHADO, Alana Cristina; RABELO, Fernanda Ellen Mercatelli; MAXIMIANO, Vinicius; LOPES, Raquel Marianna; ARANHA, Ana Cecilia Corrêa; SCARAMUCCI, Taís. Effect of in-office desensitizers containing calcium and phosphate on dentin permeability and tubule occlusion. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 86, p. 53-59, jul. 2019. Elsevier BV.
106. RUSIN, Richard P.; AGEE, Kelli; SUCHKO, Michael; PASHLEY, David H.. Effect of a new desensitizing material on human dentin permeability. **Dental Materials**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 600-607, jun. 2010.
107. KINNEY, J.H.; MARSHALL, S.J.; MARSHALL, G.W.. The Mechanical Properties of Human Dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. **Critical Reviews In Oral Biology & Medicine**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 13-29, jan. 2003.
108. KINNEY, J.H.; BALOOCH, M.; MARSHALL, S.J.; MARSHALL, G.W.; WEIHS, T.P.. Hardness and young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. **Archives Of Oral Biology**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 9-13, jan. 1996.

109. KANDIL, Hebatalla E.; LABIB, Ahmed H.; ALHADAINY, Hatem A.. Effect of different irrigant solutions on microhardness and smear layer removal of root canal dentin. **Tanta Dental Journal**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-11, abr. 2014.
110. EBADIFAR, Asghar; NOMANI, Mohammad; FATEMI, Sayed Ali. Effect of nano-hydroxyapatite toothpaste on microhardness of artificial carious lesions created on extracted teeth. **Journal Of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 14-17, 15 mar. 2017.
111. LIN, Xuandong; XIE, Fangfang; MA, Xueling; HAO, Yuhong; QIN, Hejia; LONG, Jindong. Fabrication and characterization of dendrimer-functionalized nano-hydroxyapatite and its application in dentin tubule occlusion. **Journal Of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [S.L.], v. 28, n. 9, p. 846-863, 31 mar. 2017.
112. LI, Na; WU, Gang; YAO, Hua; TANG, Ruikang; GU, Xinhua; TU, Chengwei. Size effect of nano-hydroxyapatite on proliferation of odontoblast-like MDPC-23 cells. **Dental Materials Journal**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 534-539, 26 jul. 2019.
113. LI, Yunfei; WANG, Wenying; HAN, Jing; LI, Zirui; WANG, Qiuxiang; LIN, Xue; GE, Kun; ZHOU, Guoqiang. Synthesis of Silver- and Strontium-Substituted Hydroxyapatite with Combined Osteogenic and Antibacterial Activities. **Biological Trace Element Research**, [S.L.], v. 200, n. 2, p. 931-942, 2 abr. 2021.
114. HUANG, Mei; HILL, Robert G.; RAWLINSON, Simon C.F.. Strontium (Sr) elicits odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs): a therapeutic role for sr in dentine repair?. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 38, p. 201-211, jul. 2016.
115. GOETTSCHE, Claudia et al. TNAP as a therapeutic target for cardiovascular calcification: A discussion of its pleiotropic functions in the body. **Cardiovascular Research**, v. 118, n. 1, p. 84-96, 2022.
116. NOGUEIRA, Lucas Fabrício Bahia et al. Curcumin-loaded carrageenan nanoparticles: fabrication, characterization, and assessment of the effects on osteoblasts mineralization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p. 112622, 2022.
117. KULTERER, Birgit et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. **BMC genomics**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2007.
118. JAISWAL, Neelam et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. **Journal of cellular biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 295-312, 1997.
119. NAYAB, Saima N.; JONES, Frances H.; OLSEN, Irwin. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4717-4727, 2005.
120. HOYLAERTS, Marc F. et al. Functional significance of calcium binding to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119874, 2015.

121. BONNELYE, Edith et al. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, v. 42, n. 1, p. 129-138, 2008.
122. CRUZ, Marcos Antônio Eufrazio et al. Lipid-mediated growth of SrCO<sub>3</sub>/CaCO<sub>3</sub> hybrid films as bioactive coatings for Ti surfaces. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 762-769, 2019.
123. ASGHARI, Fatemeh; SALEHI, Roya; AGAZADEH, Marziyeh; ALIZADEH, Effat; ADIBKIA, Khosro; SAMIEI, Mohammad; AKBARZADEH, Abolfazl; AVAL, Negar Abbasi; DAVARAN, Soodabeh. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on hydroxyapatite-coated biodegradable nanofibrous scaffolds. **International Journal Of Polymeric Materials And Polymeric Biomaterials**, [S.L.], v. 65, n. 14, p. 720-728, 13 abr. 2016.
124. ABDALLA, Mohamed Mahmoud; LUNG, Christie Y. K.; BIJLE, Mohammed Nadeem; YIU, Cynthia Kar Yung. Physicochemical Properties and Inductive Effect of Calcium Strontium Silicate on the Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells for Vital Pulp Therapies: an in vitro study. **Materials**, [S.L.], v. 15, n. 17, p. 5854, 25 ago. 2022.
125. VAGROPOULOU, Georgia; TRENTSIU, Maria; GEORGOPOULOU, Anthie; PAPACHRISTOU, Eleni; PRYMAK, Oleg; KRITIS, Aristeidis; EPPL, Matthias; CHATZINIKOLAIDOU, Maria; BAKOPOULOU, Athina; KOIDIS, Petros. Hybrid chitosan/gelatin/nanohydroxyapatite scaffolds promote odontogenic differentiation of dental pulp stem cells and in vitro biomineralization. **Dental Materials**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 23-36, jan. 2021.
126. CHING, Hii Siew; PONNURAJ, Kannan Thirumulu; LUDDIN, Norhayati; RAHMAN, Ismail Ab; GHANI, Nik Rozainah Nik Abdul. Early Odontogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Treated with Nanohydroxyapatite–Silica–Glass Ionomer Cement. **Polymers**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 2125, 17 set. 2020.