

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

SÍDNEI NAHORNY

**ESTUDO, *IN VITRO*, DA APLICAÇÃO DE NANOBIMATERIAIS NA PROTEÇÃO
CONTRA A EROSÃO ÁCIDA NA DENTINA**

São Jose dos Campos, SP

2014

Sídnei Nahorny

**ESTUDO, *IN VITRO*, DA APLICAÇÃO DE NANOBIMATERIAIS NA PROTEÇÃO
CONTRA A EROÇÃO ÁCIDA NA DENTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo
Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Silva Soares

São Jose dos Campos, SP

2014

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Nahórny, Sídney

ESTUDO, IN VITRO, DA APLICAÇÃO DE NANOBIMATERIAIS NA PROTEÇÃO CONTRA A EROÇÃO ÁCIDA NA DENTINA / Sídney Nahórny; orientador, Luís Eduardo Silva Soares; co-orientador Anderson de Oliveira Lobo. - São José dos Campos, SP, 2014.

73 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

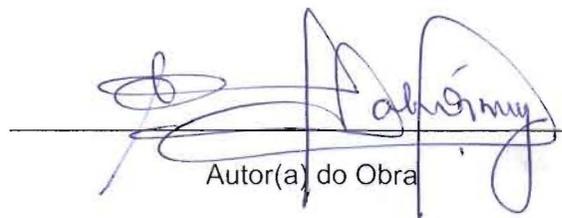
1. Engenharia Biomédica. 2. dentina. 3. nanobiomateriais. 4. espectroscopia FT-Raman. 5. microscopia eletrônica de varredura. I. Silva Soares, Luís Eduardo, orient. II. de Oliveira Lobo, Anderson, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Sídney Nahórny, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 10 de Março de 2014.



Autor(a) do Obra

Data da defesa: 27 / 02 / 2014

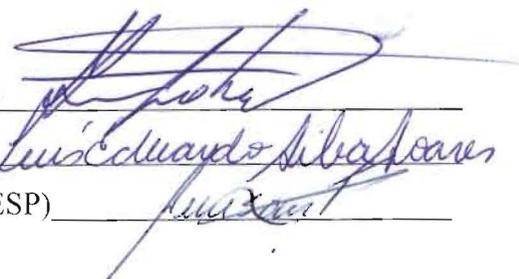
**“ESTUDO, *IN VITRO*, DA APLICAÇÃO DE NANOBIMATERIAIS NA PROTEÇÃO CONTRA A
EROSÃO ÁCIDA NA DENTINA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **ANDERSON DE OLIVEIRA LOBO** (UNIVAP)

Prof. Dr. **LUIS EDUARDO SILVA SOARES** (UNIVAP)

Prof^a. Dra. **ANA MARIA DO ESPIRITO SANTO** (UNIFESP)



The image shows three handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal line. The first signature is for Anderson de Oliveira Lobo, the second for Luis Eduardo Silva Soares, and the third for Ana Maria do Espírito Santo.

Prof^a. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 27 de fevereiro de 2014.

Primeiro agradeço à Deus, pela minha vida, pela força e coragem que me foram dadas em todos os aspectos da minha vida.

Aos meus pais (*in memorian*) André Nahorny e Benedicta R. C. Nahorny pelos bons exemplos e educação que me foram dados que fizeram com que me tornasse uma pessoa ainda melhor. Saudades.

À minha irmã Sandra A. Nahorny por me receber em sua casa aos finais de semana, substituindo a ausência de minha mãe, sempre me estimulando e me orientando nessa nova jornada.

À minha irmã Sônia A. Conceição (*in memorian*) que sei que estará orgulhosa de mim também pelo bom trabalho que realizei nesta etapa.

Aos meus sobrinhos que entenderam a minha ausência durante os dois anos de curso.

À minha querida amiga Maria do Carmo Silva Soares pelo carinho e amizade de muitos anos.

A todos sou muito grato.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador, Dr. Luís Eduardo Silva Soares, pelos ensinamentos, dedicação e paciência a mim dispensados, nesses dois anos de Mestrado. Ao meu professor e co-orientador, Dr. Anderson de Oliveira Lobo pelos seus ensinamentos ao qual vou levar pra sempre e pela sua amizade também.

A FVE, Fundação Vale Paraibana de Ensino pela bolsa a mim concedida para a realização do meu trabalho de pesquisa.

Aos professores que ministraram aulas no primeiro semestre, pela atenção e carinho a mim dispensados.

Aos meus amigos do curso de Mestrado que nessa jornada também estavam com suas tarefas e responsabilidades, em especial à minha querida amiga Liliane Pereira e Caroline El'Saman pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas da iniciação científica, Mustafá Mohamed Zogbi Junior, Marina Fernandes Stein, Gislene Rodrigues da Silva e Juarez Magalhães pela ajuda nos experimentos realizados.

Agradeço também à funcionária da Univap, Priscila Leite que me auxiliou nas leituras no MEV.

À todos os colegas do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVVB) que sempre estiveram ao meu lado, me dando força e estímulo .

Ficam aqui meus sinceros agradecimentos a todos vocês!

“a imagem daquilo que fazemos no presente sempre servirá para nos identificar no futuro”
(autor desconhecido).

ESTUDO, *IN VITRO*, DA APLICAÇÃO DE NANOBIMATERIAIS NA PROTEÇÃO CONTRA A EROÇÃO ÁCIDA NA DENTINA

RESUMO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi de avaliar, por espectroscopia FT-Raman e microscopia eletrônica de varredura o potencial anti-erosivo de compósitos de nanotubos de carbono/Grafeno (NTC/Grafeno), nanohidroxiapatita (nHAp) e materiais híbridos (NTC/Grafeno/nHAp) comparado com aplicações de flúor em gel. Vinte e um dentes incisivos bovinos foram limpos, divididos em 2 partes (n=42), polidos e separados em sete grupos experimentais: G1 (controle) – tratamento com saliva artificial; G2 - Flúor gel ácido (FG); G3 – nanohidroxiapatita sintética (nHAp); G4 – NTC/Grafeno; G5 – FG + nHAp; G6 – FG + NTC/Grafeno e G7 – FG + NTC/Grafeno/nHAp. Todos os dentes foram previamente condicionados com ácido fosfórico a 37% por 15 seg. para realizar a exposição dos túbulos dentinários simulando assim pacientes com sensibilidade dentinária. As amostras dos grupos 2, 5, 6 e 7 receberam uma aplicação de Flúor Fosfato Acidulado 1,23% em gel (1 min.). A análise por espectroscopia FT-Raman foi realizada após a aplicação dos biomateriais com a coleta de 3 espectros por amostra. Em seguida, as amostras foram submetidas a seis ciclos, alternando desmineralização e remineralização e as amostras do grupo 1 (controle) foram tratadas apenas com saliva artificial. A desmineralização foi realizada com suco de laranja (Minute Maid[®], Coca-Cola[®] Brazil) e a remineralização entre cada ciclo com saliva artificial por 1 h a 37°C.). Após a ciclagem, nova leitura por espectroscopia FT-Raman foi realizada. Amostras antes e após a erosão foram selecionadas para coletar micrografias por MEV. A banda do fosfato não foi significativamente afetada pelos tratamentos. O teor de carbonato aumentou no G3 após a erosão pela possível interação da saliva com a nHAp. O compósito NTC/Grafeno/nHAp parece promover níveis mais baixos de exposição de colágeno do que os outros tratamentos, formando uma barreira adicional. Após a ciclagem erosiva ocorreu uma redução na intensidade da banda G ' no espectro FT-Raman indicando uma remoção de nanotubos de carbono por erosão ácida. As micrografias mostraram que os grupos que receberam os nanotubos de carbono permaneceram com partículas nHAp pela superfície e envelados de NTC após a ciclagem erosiva, indicando assim uma interação positiva com a dentina.

Palavras-chave: Dentina. Erosão Ácida. Nanotubos de Carbono. Nanohidroxiapatita. Espectroscopia FT-Raman. Microscopia Eletrônica de Varredura.

***IN VITRO* STUDY OF THE APPLICATION OF NANOBIMATERIALS IN PROTECTION OF DENTIN AGAINST ACID EROSION**

ABSTRACT

The aim of this *in vitro* study was to investigate, by FT-Raman spectroscopy and scanning electron microscopy the anti-erosion potential of carbon nanotubes/Graphene (CNT/Graphene) composite, nanohydroxyapatite (nHAp) and hybrid materials (CNT/Graphene/nHAp composite) compared with fluoride gel applications. Twenty-one anterior bovine teeth were cleaned, polished, divided into two parts (n=42) and assigned to seven groups: G1 (control) – artificial saliva treatment; G2 - Fluoride gel (FG); G3 – synthetic nanohydroxyapatite (nHAp); G4 – CNT /Graphene; G5 – FG + nHAp; G6 – FG + CNT /Graphene and G7 – CNT /Graphene/nHAp. All teeth were previously etched with 37% phosphoric acid for 15 sec. to perform the exposure of dentinal tubules thus simulating patients with dentinal sensitivity. The samples of groups 2, 5, 6 and 7 received an application of 1.23% acidulated phosphate fluoride gel (1 min.). Analysis by FT-Raman spectroscopy was performed after application of biomaterials by collecting 3 spectra per sample. Then, the samples were submitted to six cycles, alternating re- and demineralisation and group 1 specimens were treated only with artificial saliva. Demineralisation was performed with the orange juice (Minute Maid[®], Coca-Cola[®] Brazil) and remineralisation with artificial saliva for 1 h at 37°C. After cycling, FT-Raman spectroscopy analysis was performed again. Samples before and after erosion were selected to collect SEM micrographs. Phosphate band was not significantly affected by treatments. Carbonate content increased in G3 after erosion by nHAp interaction. CNT /Graphene/nHAp composite seems to promote lower levels of collagen exposure than the other treatments by forming an additional barrier. After erosive cycling a reduction in the intensity of the G' band in the FT-Raman spectra occurred indicating a removal of CNT by acid erosion. SEM micrographs showed that the groups which received the CNT maintained nHAp particles and coils of CNT after the erosive cycling, thus indicating a positive interaction with the dentin.

Keywords: Dentin. Acid Erosion. Carbon Nanotubes. Nanohydroxyapatite. FT-Raman Spectroscopy. Scanning Electron Microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Dente humano dividido em duas partes ilustrando as diferentes estruturas: esmalte, junção esmalte-dentina (JED), dentina e polpa	16
Figura 2: Dente humano cortado ilustrando as camadas da dentina: dentina superficial (A) e profunda (B) com as respectivas micrografias obtidas por MEV ilustrando o diâmetro e o número de túbulos dentinários. À medida que a dentina fica com menor espessura (de A para B) a permeabilidade da dentina aumenta	17
Figura 3: Representação esquemática nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) e nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT)	25
Figura 4: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de filmes de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) verticalmente alinhados obtidos com catalisadores de Fe e Ni	26
Figura 5: Máquina de corte de precisão utilizada na preparação das amostras	32
Figura 6: Primeiro corte do dente separando-se a coroa da raiz (A). Segundo corte realizado na amostra para padronizar a medida (B).....	33
Figura 7: Segundo corte realizado na amostra para padronizar a medida	34
Figura 8: Figura esquemática da amostra de dentina ilustrando o posicionamento dos pontos onde os espectros foram coletados	35
Figura 9: Espectrômetro FT-Raman utilizado no estudo	35
Figura 10: Amostra posicionada no porta-amostras com o auxílio de uma massa de modelar	Erro! Indicador não definido.
Figura 11: Aplicação de ácido fosfórico a 37% (A); Lavagem em água corrente (B).....	36
Figura 12: Flúor gel acidulado (DFL) (A); Flúor gel aplicado sobre a dentina (B).....	37
Figura 13: Compósito NTC/Grafeno/nHAp em sua forma granulada (A); Compósito NTC/Grafeno/nHAp em sua forma homogênea após trituração manual (B)	38
Figura 14: Dispersão da nHAp (A), Dispersão do compósito NTC/Grafeno (B) e Dispersão do do compósito NTC/Grafeno/nHAp (C)	39
Figura 15: Amostras em cada compartimento da placa contendo 3,0 ml de solução de nHAp (A); Placa tampada e identificada contendo as amostras dos grupos G3 e G5 (B)	39
Figura 16: Amostras em cada compartimento da placa contendo 3,0 ml de solução do compósito NTC/Grafeno (A); Placa tampada e identificada contendo as amostras dos grupos G4 e G6 (B)	40
Figura 17: Amostras em cada compartimento da placa contendo 3,0 ml de solução do compósito NTC/Grafeno/nHAp (A), placa tampada e identificada contendo as amostras do grupo G7 (B)	40
Figura 18: Placas contendo as amostras dos grupos G3-G7 inseridas no interior uma incubadora refrigerada de piso (A); Painel indicando ajustes de temperatura e velocidade (B)	41
Figura 19: Série graduada de álcool para desidratação das amostras (A); Amostras em processo de metalização (B).....	43

Figura 20: Espectros FT-Raman da dentina bovina para os grupos de tratamento após a aplicação dos biomateriais comparado com grupo sem tratamento (Normal)	44
Figura 21: Espectros FT-Raman da dentina bovina para os grupos de tratamento após a aplicação dos biomateriais seguido da erosão comparado com grupo sem tratamento (Normal)	45
Figura 22: Espectros FT-Raman da dentina bovina para os grupos de tratamento após a aplicação dos biomateriais comparado com grupo sem tratamento (Normal) evidenciando a região da banda G1' em 2570 cm^{-1}	46
Figura 23: Espectros FT-Raman da dentina bovina para os grupos de tratamento após a aplicação dos biomateriais seguido de erosão comparado com grupo sem tratamento (Normal) evidenciando a região da banda G1' em 2570 cm^{-1}	46
Figura 24: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 960 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos de tratamento	47
Figura 25: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 960 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos sem aplicação prévia de flúor	47
Figura 26: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 960 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos com aplicação prévia de flúor	48
Figura 27: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 1070 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos de tratamento. As diferenças estatísticas significantes são representadas pelo asterisco (*).....	49
Figura 28: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 1070 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos sem aplicação prévia de flúor	49
Figura 29: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 1070 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos com aplicação prévia de flúor	50
Figura 30: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 2940 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos de tratamento. As diferenças estatísticas significantes são representadas por: letras maiúsculas diferentes para comparações entre o controle e os grupos com biomateriais antes da erosão, letras minúsculas diferentes para comparações em um mesmo grupo antes e após a erosão, diferenças significantes entre o grupo 2 e os grupos 4 e 5 são representadas pelo asterisco (*)	51
Figura 31: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 2940 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos sem aplicação prévia de flúor	51
Figura 32: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 2940 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos com aplicação prévia de flúor. As diferenças estatísticas significantes são representadas por: letras maiúsculas diferentes para comparações entre o grupo 2 (flúor) e os grupos com biomateriais antes da erosão, letras minúsculas diferentes para comparações	

entre os grupos após a erosão, diferenças significantes entre os grupos 6 e 7 antes da erosão são representadas pelo asterisco (*)52

Figura 33: Micrografias obtidas dos nanobiomateriais produzidos: compósito NTC/Grafeno (A); detalhes das folhas de grafeno (B); Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrando os NTC em forma de bambu (C) e aglomerados de folhas de grafeno (D); Micrografia obtida por MEV do composto NTC+ nHAp (E) 53

Figura 34: Micrografias obtidas da superfície da dentina normal com aplicação prévia de ácido fosfórico. Superfície da dentina antes e depois da ciclagem erosiva dos grupos: G1 – saliva artificial antes da erosão (A); Após a erosão (B); G2 – flúor fosfato acidulado (FG) em gel, 1 min antes da erosão (C); Após a erosão (D) (aumento de 5000x) **Erro! Indicador não definido.**

Figura 35: Micrografias obtidas da superfície da dentina normal com aplicação prévia de ácido fosfórico. Superfície da dentina antes e depois da ciclagem erosiva dos grupos: G3 – nanohidroxiapatita (nHAp) antes (A); após a erosão (B); G4 – Compósito Nanotubos de carbono (NTC)/Grafeno antes da erosão (C); após a erosão (D) (aumento de 5000x).55

Figura 36: Micrografias obtidas da superfície da dentina normal com aplicação prévia de ácido fosfórico. Superfície da dentina antes e depois da ciclagem erosiva dos grupos: G5 – FG + nHAp antes da erosão (A); Após a erosão (B); G6 – FG + compósito NTC/Grafeno antes da erosão (C); Após a erosão (D); G7 - FG + compósito NTC/Grafeno/nHAp antes da erosão (E); Após a erosão (F) (aumento de 5000x) 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais.....	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HAp – Hidroxiapatita (fosfato de cálcio hidratado)

NTCs – Nanotubos de Carbono

PO_4^{3-} – Fosfato

OH_2 – Hidróxido de Cálcio

Ca – Cálcio

P – Fósforo

PRP – Plasma Rico em Plaqueta

pH – Potencial Hidrogênionico

SWCNT – Nanotubos de Carbono de Parede Simples

MWCNT – Nanotubos de Carbono de Múltiplas Paredes

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

ER – Espectroscopia Raman

IR – Espectroscopia no Infra-Vermelho

CO_3^{2-} – Carbonato

FT – Transformada de Fourier

RPM – Rotação por Minuto

G – Grupo

X – Eixo X

Y – Eixo Y

Z – Eixo Z

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. A estrutura dental.....	15
1.2. Erosão dental	17
1.3. Tratamento da erosão dental.....	20
1.4. Flúor.....	21
1.5. Hidroxiapatita.....	22
1.6. Nanotubos de carbono.....	24
1.7. Técnicas de análise.....	27
1.7.1. Espectroscopia Raman	27
1.7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Seleção dos dentes.....	32
3.2. Preparação das amostras	32
3.3. Análise por espectroscopia FT-Raman	35
3.4. Tratamentos iniciais	36
3.5. Preparação dos biomateriais	37
3.6. Ciclagem erosiva	41
3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão (MEV)	42
3.8. Análise dos dados.....	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Espectroscopia FT-Raman	44
4.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	52
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	62
7. TRABALHOS FUTUROS	63
REFERÊNCIAS	64
REFERENCIAS CONSULTADAS	71
ANEXO A – CERTIFICADO CEUA	71

1. INTRODUÇÃO

As condições de saúde bucal podem interferir muito na vida das pessoas dentro de seu cotidiano, seja para o trabalho ou para o estudo, pois a aparência nesse caso conta muito. Assim, a procura dos pacientes por estética é muito grande nos consultórios odontológicos e com ela cria-se a demanda de pesquisas por parte dos fabricantes de novos materiais ou produtos que atendam a estas necessidades.

No passado algumas pessoas achavam que a Odontologia era uma profissão que estava com dos dias contados, mas foi puro engano, o paciente sem dor, e com os dentes na boca passou a solicitar soluções estéticas, não queria mais o sorriso metálico, não aceitava mais nem o dente escurecido, nem o mal posicionado. Estava iniciando um longo ciclo da Odontologia estética (GARONE FILHO; SILVA, 2008).

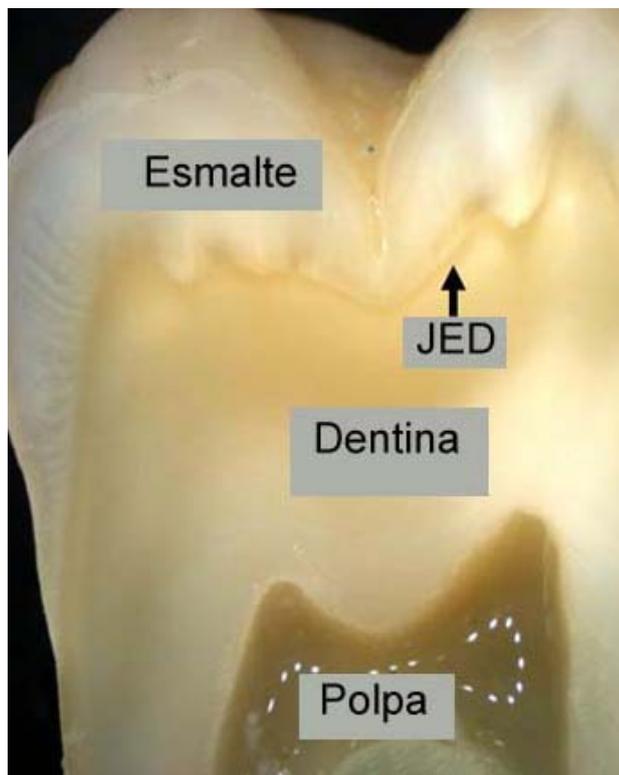
Além da preocupação com a estética, a atenção deve ser direcionada também para patologias relacionadas ao desgaste da estrutura dentária. O desgaste da estrutura dental é um fator que tem apresentado um aumento de incidência nos últimos anos, sendo que a contribuição da erosão dental para o desgaste dos dentes, principalmente entre as crianças e jovens adultos, também apresentou um avanço (JAEGGI; LUSSI, 2006; CORRER et al., 2009).

Os desgastes dentários são cumulativos e irreversíveis durante a evolução da idade com a expectativa de vida aumentada, e as pessoas mantendo a dentição natural por mais tempo, os problemas relacionados aos desgastes dentários tornam-se mais evidentes (CARVALHO et al., 2008). A ocorrência e o padrão do desgaste dentário estão relacionados a fatores educacionais, culturais, dietéticos, ocupacionais e geográficos dos indivíduos (CARVALHO et al., 2008). Para entender a dinâmica do processo erosivo deve-se conhecer a estrutura e composição química dos elementos que constituem o dente e as regiões mais afetadas do mesmo.

1.1. A estrutura dental

A dentina é um tecido conjuntivo avascular, mineralizado, especializado que forma o corpo do dente, suportando e compensando a fragilidade do esmalte. A dentina é recoberta pelo esmalte na sua porção coronária e pelo cimento na porção radicular (Figura 1).

Figura 1: Dente humano dividido em duas partes ilustrando as diferentes estruturas: esmalte, junção esmalte-dentina (JED), dentina e polpa.



Fonte: adaptado (PARK; SCHNEIDER; HAAK, 2013).

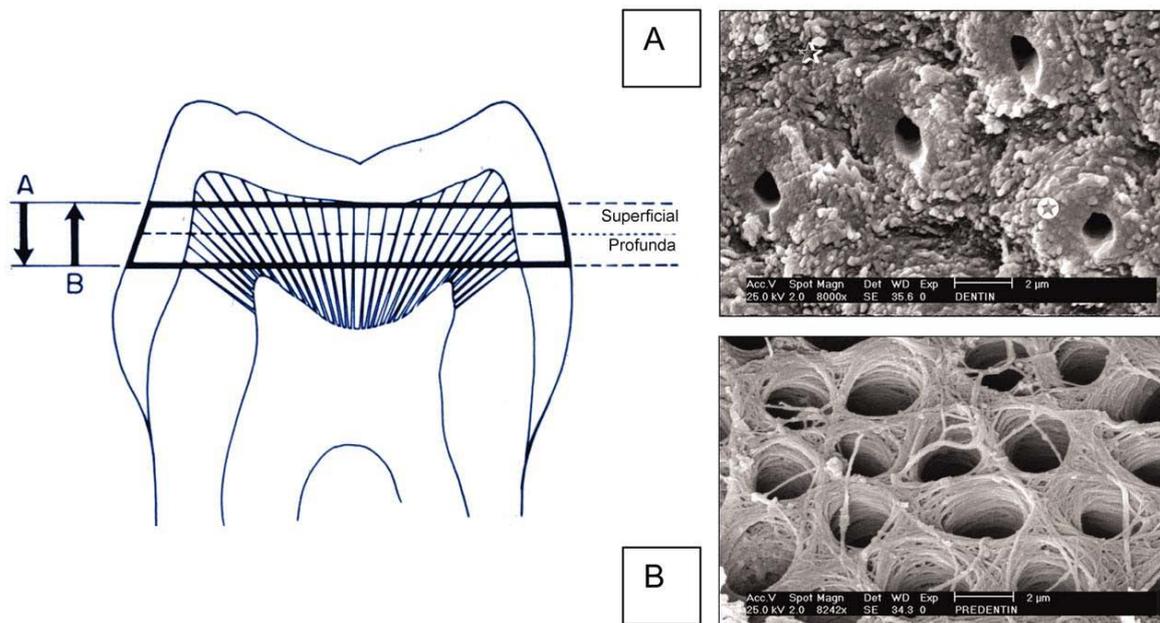
Sua superfície interna delimita a cavidade pulpar onde se aloja a polpa dentária. Por ser um tecido vivo, contém prolongamentos de células especializadas e substância intercelular. A dentina e a polpa formam um complexo em íntima relação topográfica, embriológica e funcional, por isso têm características biológicas comuns (LIMA et al., 2010).

A dentina caracteriza-se pela presença de múltiplos túbulos dentinários (Figura 2) dispostos muito próximos, que atravessam toda a sua espessura e contêm as extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, os quais formaram a dentina e, agora, a mantêm. Os corpos celulares dos odontoblastos alinham-se ao longo da face interna da dentina, formando, também, o limite periférico da polpa dentária (LIMA et al., 2010).

A dentina madura é composta, por volume, aproximadamente, de 50% material inorgânico, 30% material orgânico e 20% de água. Seu componente inorgânico consiste principalmente em hidroxiapatita (Hap) e a fase orgânica em colágeno. A porção orgânica consta de fibras colágenas (17%), dispostas em pequenos feixes ao redor e entre os prolongamentos odontoblásticos. Estas fibras são unidas e cimentadas pela substância amorfa de natureza glicoproteica (SCHILKE et al., 2000).

A Hap é o constituinte principal da fase mineral dos tecidos calcificados. Sua fórmula estequiométrica é $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, com a razão $Ca/P = 1,67$ (COSTA et al., 2009). A Hap é um fosfato de cálcio hidratado, componente majoritário (95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos. Produzida a partir de Hidróxido de cálcio e Ácido Fosfórico, representa cerca de 30% a 70% da massa dos ossos e dos dentes.

Figura 2: Dente humano cortado ilustrando as camadas da dentina: dentina superficial (A) e profunda (B) com as respectivas micrografias obtidas por MEV ilustrando o diâmetro e o número de túbulos dentinários. À medida que a dentina fica com menor espessura (de A para B) a permeabilidade da dentina aumenta.



Fonte: (adaptado de BOUILLAGUET, 2004).

1.2. Erosão dental

O consumo de sucos de frutas, refrigerantes e isotônicos tem aumentado ao redor do mundo nos últimos anos (HOOPER et al., 2007). Assim, a exposição dos dentes a um ambiente ácido está se tornando comum, e a erosão vem tornando-se uma das principais causas para o desgaste dos dentes. Compreender a erosão dental pode ajudar no tratamento clínico deste tipo de desgaste dentário e auxiliar no desenvolvimento de novos materiais restauradores (ZHENG et al., 2009).

A erosão dental pode ser descrita como o resultado físico de uma perda patológica, crônica, localizada e assintomática dos tecidos dentais duros pelo ataque químico da

superfície do dente por ácido e/ou quelante, sem o envolvimento de bactérias (CARVALHO FILHO et al., 2011; SOARES et al., 2012).

Os primeiros sinais da erosão dental são: diminuição do brilho do esmalte, ausência de placa macroscópica (GANDARA; TRUELOVE, 1999) e polimento das superfícies dentais atingidas pelos ácidos, devido à perda da microanatomia (ALMEIDA E SILVA et al., 2007; BRANCO et al., 2008). A fina camada de esmalte, resultante do processo de erosão, resulta em aspecto de dentes amarelados, o que compromete a estética.

As sequelas da erosão dental em casos avançados podem incluir erupção compensatória dos dentes erodidos formação de diastemas, alteração da dimensão vertical de oclusão (BARRON et al., 2003; MACHADO et al., 2007) dor muscular provocada pela instabilidade oclusal e disfunção da articulação temporomandibular (MACHADO et al., 2007).

O resultado da soma de todos esses fatores é um quadro clínico antiestético e antifuncional, que pode ser resolvido com a devida orientação ao paciente quanto à alimentação e hábitos de vida que favoreçam o desgaste dental, além de procedimentos restauradores convencionais, diretos ou indiretos, dependendo do nível de perda estrutural (BRANCO et al., 2008).

Os agentes desmineralizantes, ou seja, os ácidos e quelantes, por si só não são capazes de provocar grandes perdas de estrutura. Este processo provoca alterações na superfície dental por meio da retirada de minerais (GARONE FILHO; SILVA, 2008).

A erosão dental é uma condição multifatorial. Para prevenir a progressão, é importante detectar esta condição o mais cedo possível. É fundamental diagnosticar os possíveis fatores de risco para que as medidas preventivas possam ser instaladas (LUSSI; JAEGGI, 2008).

O mecanismo de erosão está presente praticamente em todas as lesões não cáries e é um tema complexo. Isso se deve não só as diferentes fontes dos ácidos e quelantes, como também devido à presença de inúmeros fatores que interferem no padrão de evolução das lesões (GARONE FILHO; SILVA, 2008).

Os ácidos responsáveis pelo mecanismo de erosão têm origens variadas. O ácido clorídrico estomacal é o único de origem intrínseca (do próprio organismo) e chega à cavidade bucal através de vômitos e regurgitações. É caracterizado, por ser um ácido forte, com pH inferior a 2, muito abaixo do pH crítico para todas as estruturas dentais (BRANCO et al., 2008; GARONE FILHO; SILVA, 2008).

Os ácidos de origem extrínsecos podem ser provenientes de diversas fontes, como medicamentos, produtos orais de uso tópico, névoa ácida (GARONE FILHO; SILVA, 2008). Os ácidos provenientes da dieta também são considerados extrínsecos e são considerados um dos principais fatores etiológicos da erosão extrínseca (WEST; HUGHES; ADDY, 2001). Os ácidos erosivos mais comumente consumidos são os ácidos fosfóricos juntamente com os ácidos das frutas, predominantemente o ácido cítrico e maleico (WEST; HUGHES; ADDY, 2001).

Os ácidos cítricos e málico são os principais ácidos hidroxil-orgânicos encontrados nas frutas, nos sucos de frutas e refrigerantes. A concentração parece depender do estado de maturação das frutas e das condições em que elas crescem. Os sucos de frutas prontos para beber possuem concentrações de ácido cítrico em torno de 0 a 3%, comparado com a concentração de 1% no suco de laranja. Em comparação o suco de limão possui concentração de 6% de ácido cítrico (WEST; HUGHES; ADDY, 2001). O ácido fosfórico é outro ácido importante consumido na dieta, no entanto, não é um hidroxil-ácido orgânico, mas um ácido mineral fraco. Os fabricantes utilizam este ácido em uma série de produtos de consumo, particularmente as bebidas de cola que contêm aproximadamente 0,1 % de ácido fosfórico (WEST; HUGHES; ADDY, 2001).

O desgaste dental é frequentemente diagnosticado na prática clínica odontológica atual, podendo ocorrer de várias formas e atingir regiões dentais específicas. Ao ser ocasionado por contato de dente contra dente, envolvendo superfícies oclusais e incisais, é denominado atrição (GRIPPO; MACEDO; ROCCO, 2004).

Em dentina a progressão da erosão é quase completamente inibida pela presença de quantidades elevadas de fluoreto *in vitro* (GANSS et al., 2001). Durante a desmineralização a matriz da dentina orgânica é exposta (KINNEY et al., 1995). Pode-se especular que esta superfície rica em colágeno atua como tampão de uma membrana evitando as camadas mais profundas da dentina de atingir baixos valores de pH e que esta camada é essencial para o efeito do fluoreto. Featherstone e Lussi (2006) afirmaram que a erosão dental por bebidas ácidas é diretamente afetada pela presença de ácido fosfórico e cítrico nestas bebidas que fornecem mecanismos de dissolução por remoção de íons de carbonato ou fosfato por íons de hidrogênio e de remoção de cálcio através da ligação com agentes quelantes.

1.3. Tratamento da erosão dental

Para o tratamento da erosão é importante, no primeiro contato com o paciente, aliviar os sintomas e controlar a evolução do processo erosivo, identificando assim os fatores erosivos e isto é feito através de uma anamnese minuciosa (GANDARA; TRUELOVE, 1999; BRANCO et al., 2008).

Após a identificação do quadro clínico o cirurgião dentista deve encaminhar o paciente a outros profissionais da área da saúde para que seja feito um tratamento em outras patologias, tendo como finalidade fazer um tratamento multidisciplinar do paciente. Antes de começar o tratamento nos dentes o paciente deve primeiro passar por médicos para que seja diagnosticado algo diferente em seu comportamento como, por exemplo, a anorexia e a bulimia e o médico entra com alguma medicação e encaminha o paciente a um psicólogo (BRANCO et al., 2008).

Atualmente existem vários tratamentos para a erosão dental, como aplicação de flúor gel tópico e bochecho, vernizes fluoretados (CARVALHO FILHO et al., 2011) enxaguatórios bucais e creme dental específico para esta condição (WEGEHAUPT et al., 2011) que alivia e muito na sensibilidade dos dentes.

Mas com o tempo e a ação da erosão o dente vai se desgastando novamente e a sensibilidade volta a trazer certo desconforto ao paciente, fazendo com que ele procure um profissional outra vez. A aplicação tópica de flúor cria uma barreira por precipitar fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície do dente, bloqueando a entrada dos túbulos dentinários e assim reduzindo a permeabilidade e a hipersensibilidade (RITTER et al., 2006).

Em casos muitos extremos de erosão o dentista acaba fazendo uma restauração no local para que finalize o problema, claro que depois de feito isso o paciente deve obedecer a uma série de cuidados com a higiene bucal na hora da escovação, por exemplo, não forçar muito a escova de dente, escovar sempre fazendo movimentos circulares nos dentes e usar sempre escovas dentais macias, para que não danifique o local tratado. Acompanhando este tratamento sempre usando fio dental, aplicação de flúor, e também fazer bochechos após a escovação para eliminar o maior número de bactérias possíveis (BRANCO et al., 2008).

Para a prevenção de cáries, é evidente que o fluoreto promove a remineralização, inibe a desmineralização dentária de tecidos duros e a sua utilização em diferentes formas e modos de aplicação tem ajudado na redução na prevalência de perda de estrutura dental devido à

cárie ao longo da última década (ALEKSEJUNIENE; HOLST; BALCIUNIENE, 2004; WEGEHAUPT et al., 2010).

1.4. Flúor

Os dentes são tecidos mineralizados e a sua superfície, o esmalte, é constituída principalmente por fosfato de cálcio cristalino. O flúor é o principal agente remineralizante indicado para prevenção e controle da erosão dental, agindo na redução da solubilidade da superfície, seguida do aumento da resistência superficial a partir da recuperação mineral (MESSIAS; SERRA; TURSSI, 2011).

O flúor é o 13º elemento mais abundante na natureza – e, também, o mais eletronegativo dos halogênios, grupo que inclui ainda o cloro, o bromo e o iodo. Com grande capacidade de reagir com outros elementos químicos e formar compostos orgânicos e inorgânicos, o flúor está presente no ar, no solo e nas águas (MURRAY, 1992; NARVAI, 2000).

O flúor continua a ser o melhor agente criado para promover a remineralização dental. Vestígios de flúor na saliva são eficazes na mudança do equilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização. Isto é atribuído à precipitação melhorada de fosfato de cálcio pelo fluoreto e a formação de flúorhidroxiapatita em tecidos dentais. A flúorapatita é menos solúvel em soluções ácidas do que a Hap, que por sua vez é menos solúvel do que apatitas carbonatadas (GJORGIEVSKA et al., 2013). A fluorapatita é mais resistente ao ataque ácido que Hap pela substituição de um grupo (OH-), que apresenta grande afinidade a compostos ácidos, por flúor (F) (CARVALHO FILHO et al., 2011).

A aplicação de flúor em esmalte provoca a formação de fluoreto de cálcio (CaF₂), o que faz com que os minerais adicionais estejam disponíveis para serem dissolvidos durante o processo de erosão na superfície do esmalte (CHEONG et al., 2012). Após a aplicação de fluoreto de sódio (NaF), precipitados de fluoreto de CaF₂ são formados no esmalte e podem promover proteção mecânica contra episódios ácidos. Estes precipitados são mais espessos na medida em que as preparações fluoretadas são mais ácidas e mais concentradas, maior é o tempo de aplicação (LEPRI et al., 2013).

Além da proteção mecânica proveniente do acúmulo de CaF₂ na superfície durante a exposição a agentes erosivos, tal mineral dissocia-se, liberando íons flúor que se complexam com íons hidrogênio da substância ácida, minimizando seu potencial em promover a

desmineralização superficial, e íons cálcio, que podem ser incorporados pela estrutura dental (MESSIAS; SERRA; TURSSI, 2011).

Nos casos de processos de desgaste dental a aplicação tópica de flúor parece exercer um efeito positivo (LUSSI; JAEGGI, 2008). Attin, Zirkel e Hellwig (1998), estudaram a influência da imersão da dentina bovina em soluções fluoretadas (250 ppm e 2.000 ppm de flúor, 1 min.) realizando a escovação em dentina erodida. Verificaram um significativo aumento na resistência ao desgaste à medida que a concentração de flúor aumenta. O tratamento com um flúor gel ligeiramente ácido aumentou a resistência à abrasão do esmalte bovino comparado com amostras sem flúor. Nestes casos, o flúor é incorporado e depositado no esmalte durante o tratamento com o gel ácido o que pode ser a razão para o aumento da resistência.

Estudos anteriores mostram que os vernizes fluoretados podem interferir com a dissolução do esmalte dental na presença de bebidas ácidas (KATO et al., 2009; CARVALHO FILHO, et al., 2011) e pode reduzir a desmineralização e aumentar a remineralização após a ciclagem de pH no esmalte sadio e em lesões de cárie artificial (MAGALHÃES et al., 2008) e após a erosão por refrigerante e suco de laranja (CARVALHO FILHO, et al., 2011).

Soares et al. (2012), avaliaram o efeito erosivo do suco de laranja na dentina radicular bovina em dentes sem restauração e com restaurações de resina composta, cimento de ionômero de vidro convencional e cimento de ionômero de vidro modificado por resina (estes dois últimos contendo flúor em sua composição). Foi avaliada a composição mineral da dentina (Ca e P) e alterações nos componentes inorgânicos dos materiais restauradores utilizando-se a micro fluorescência de raios-x. Os autores concluíram que a resina composta apresentou a maior resistência à erosão química e que o flúor contido no ionômero de vidro convencional pareceu exercer algum efeito protetor na dentina ao redor das restaurações, mostrando assim o efeito benéfico do flúor, mesmo em concentrações mínimas.

1.5. Hidroxiapatita

A Hap – Hidroxiapatita (fosfato de cálcio hidratado) é classificada como um dos melhores materiais biocompatíveis e bioativos e os recobrimentos com Hap possuem muitas aplicações biológicas, tais como implantes dentários ou esqueléticos e como arcabouços de reparação óssea (LOBO et al., 2010). Há um grande interesse em sua produção, pois a Hap

tem propriedades de biocompatibilidade e de osteointegração, o que a torna ótima para a substituição óssea (COSTA et al., 2009).

Recentemente os nanocristais de Hap (nHap) também têm sido estudadas como um material para servir como base (arcabouço) para processos de remineralização da dentina após erosão ou processos cariosos (BESINIS; VAN NOORT; MARTIN, 2012). O mesmo material também possui aplicação em esmalte dental na prevenção da erosão (LI et al., 2008).

Dependendo do processo de fabricação utilizado para obtenção da Hap suas propriedades apresentam características físico-químicas diferentes. Vários métodos de síntese têm sido utilizados para preparação da Hap, porém o método de precipitação por via úmida é o preferido, devido ao produto produzido apresentar características similares às do tecido ósseo e dentário. A Hap sintética é biocompatível, não é carcinogênica e nem alergênica (COSTA et al., 2009).

Os esqueletos de algumas espécies marinhas também são fontes deste mineral. Alguns contêm carbonato de cálcio, porém a maioria contém fosfato de cálcio. Alguns autores acreditam que depósitos de apatitas podem também ser formados por precipitação direta da água do mar, e alguns dos depósitos de carbonatos de cálcio são convertidos em apatita pela reação direta com fosfato dissolvido (MAVROPOULOS, 1999).

Dois tipos de Hap devem ser considerados: as sintetizadas em altas temperaturas que apresentam boa cristalinidade e tamanho de cristais grandes, e as Hap sintetizadas em baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos (FULMER; MARTIN; BROWN, 1992). Uma particularidade da Hap como um biomaterial é a sua temperatura de síntese de calcinação, taxa de gotejamento, taxa de agitação e uma grande concentração dos reagentes.

Avanços recentes na biomineralização destacam que as nHap, por serem menores, podem se aproximar mais das características das apatitas biológicas do que as grandes partículas das Hap que são tradicionalmente utilizadas (LI et al., 2008). Com isso, a produção de nHap sintética assistida pela técnica de ultrassom torna-se emergente, pelo fato de produzir de forma rápida, eficiente e sem a necessidade do processo de calcinação (BARBOSA, 2013).

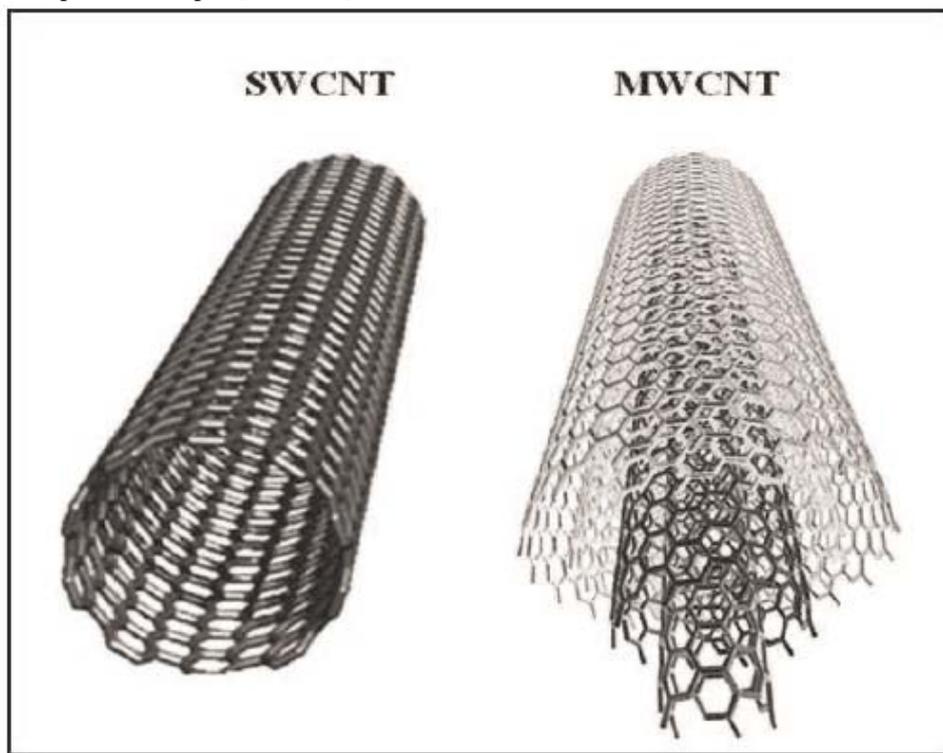
1.6. Nanotubos de carbono

Atualmente, as pesquisas envolvendo nanotubos de carbono (NTC) abrangem testes deste material como suporte para crescimento celular, transfecção e silenciamento gênico, detecção de microrganismos, carregamento e liberação de drogas, sequenciamento rápido de DNA, entre outros (PEREIRA, 2009).

Os NTC foram descobertos por Iijima em 1991. Os NTC são formados de arranjos hexagonais de carbono que originam pequenos cilindros (HERBST; MACEDO; ROCCO, 2004) (Figura 3). Considerando a estrutura dos NTC, estes podem ser diferenciados em dois tipos: os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT – *single wall carbon nanotube*), que podem ser considerados como uma única folha de grafeno enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico com diâmetro de 0.4-2nm, e os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT – *multi-walled carbon nanotube*) que compreendem um conjunto de nanotubos concêntricos apresentando diâmetro entre 2-100nm (HERBST; MACEDO; ROCCO, 2004; SMART et al., 2006; PEREIRA, 2009) (Figura 3).

Os MWCNT super hidrofílicos verticalmente alinhados (VAMWCNT-O2) são de interesse atualmente nas pesquisas devido às suas excelentes propriedades mecânicas e características biomiméticas (NEVES et al., 2013). Segundo o estudo de Smart et al. (2006), tanto os SWCNT como os MWCNT apresentavam as seguintes vantagens: eram materiais insolúveis, apresentavam uma tensão mecânica, grande área superficial, resistência, suscetíveis a modificação química e, principalmente, eram biocompatíveis.

Figura 3: Representação esquemática nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) e nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT).



Fonte: (CHOUDHARY; GUPTA, 2011).

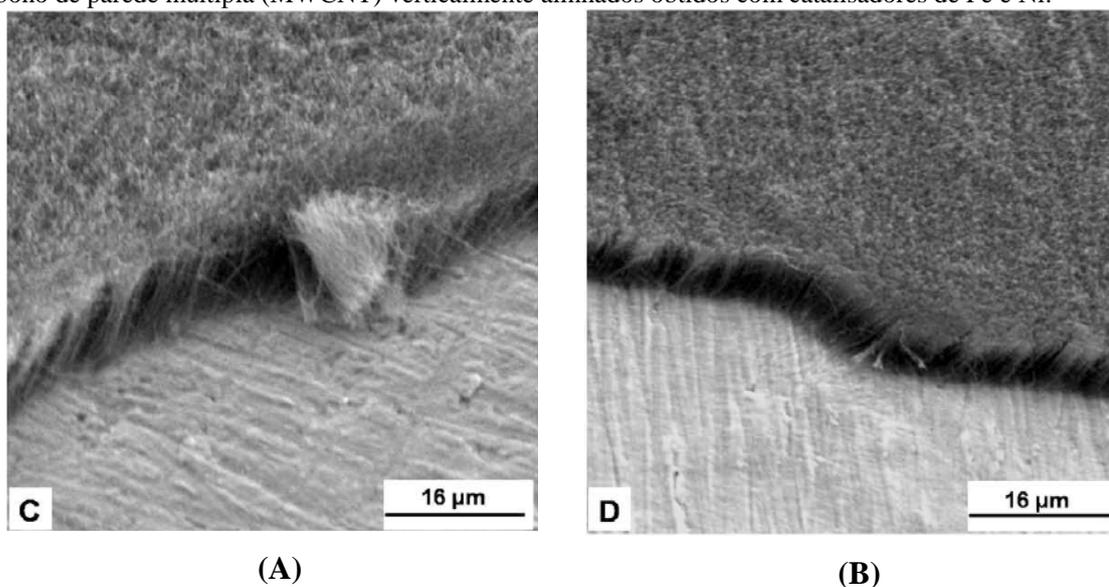
A descoberta de que o carbono pode formar estruturas estáveis ordenadas e diferentes de grafite e diamante estimulou muitos pesquisadores do mundo para a busca por outros alótropos de carbono. A palavra nanotubo é derivada de seu tamanho porque o diâmetro de um nanotubo é de ordem de poucos nanômetros, aproximadamente 50.000 vezes menor do que a largura de um fio de cabelo humano e pode ser de até vários micrometros de comprimento (SUMIO, 1991).

Os NTC são usados como reforços mecânicos, em compósitos de alto desempenho, os emissores de nanotubos de carbono baseados em campo e sua utilização como nanossondas em metrologia e investigações biológicas e químicas e modelos para a criação de outras nanoestruturas (AJAYAN; ZHOU, 2001).

Com relação à biocompatibilidade dos NTC, um estudo recente realizado por Lobo et al. (2010) avaliou filmes de MWCNT produzidos por deposição química por plasma de microondas em substratos de titânio com ferro e níquel utilizados como catalisadores. Foram utilizadas células de fibroblastos L-929 de ratos para avaliar a adesão celular e a morfologia após um período de incubação de 7 dias. Um baixo nível de biodisponibilidade de Fe e Ni foram determinados por espectroscopia de emissão de plasma induzido. As micrografias

obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 4) mostram a alta densidade dos filmes de MWCNT crescidos nos catalisadores Fe e Ni, onde o Fe produziu nanoilhas mais densas (Figura 4A) do que aqueles produzidos por Ni (Figura 4B). Os autores relataram que o eficiente crescimento celular e a não toxicidade sugerem a aplicação dos MWCNT em regeneração tecidual.

Figura 4: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de filmes de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) verticalmente alinhados obtidos com catalisadores de Fe e Ni.



Fonte: (LOBO et al., 2010).

A aplicação dos NTC na Odontologia é recente e limitada a poucos estudos (ZHANG et al., 2008; AKASAKA et al., 2009). Zhang et al. (2008) avaliaram por medidas de resistência à flexão, os efeitos da aplicação de SWCNT em resinas compostas dentais. A modificação nos nanotubos foi feita através da deposição de uma fina camada nanométrica de SiO₂ sendo esta modificação avaliada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET). O resultado obtido foi que os nanotubos melhoraram a resistência à flexão da resina. Os resultados obtidos por MET mostraram uma diminuição dramática no agrupamento de SWCNT, provando que a dispersão de SWCNT na resina foi boa.

Akasaka et al. (2009) em seu estudo recente mostraram que os NTC podem ser utilizados como materiais biomédicos devido às suas propriedades únicas. Foram investigadas as alterações induzidas nas superfícies de fatias de dente através da aplicação de um revestimento de NTC e as alterações foram observadas tanto macroscopicamente como por micrografias obtidas pela técnica de MEV. Os NTC aderiram facilmente às superfícies do

dente, quando os cortes foram suspensos numa solução de NTC dispersa. Verificou-se que os NTC ficaram seletivamente aderidos às superfícies de dentina e cimento, possivelmente por aderirem as suas fibras colágenas expostas. Além disso, o revestimento de NTC não afetou a força de resistência de união de adesivos dentinários. Estes resultados indicam que a cobertura dos dentes com os NTC pode ser uma possível aplicação dos mesmos como materiais odontológicos.

1.7. Técnicas de análise

Técnicas de análise importantes como a espectroscopia e a microscopia eletrônica de varredura podem ser utilizadas em estudos avaliando a composição e a morfologia da estrutura dental. Uma breve revisão sobre estas técnicas é apresentada a seguir.

1.7.1. Espectroscopia Raman

Dentre as técnicas que permitem obter informações sobre a estrutura molecular e as ligações químicas, podemos citar a Espectroscopia Raman (ER) e a Espectroscopia no Infravermelho (IR). A radiação espalhada pelas moléculas contém fótons com a mesma frequência da radiação incidente, mas pode conter também um pequeno número de fótons com a frequência alterada ou deslocada. O processo espectroscópico da medida destes fótons deslocados foi chamado de Espectroscopia Raman. Na espectroscopia Raman, uma amostra é irradiada com uma fonte de luz monocromática (normalmente um laser). Neste processo, a maior parte da radiação será espalhada da amostra no mesmo comprimento de onda da radiação laser incidente, ou seja, espalhamento elástico, cujo processo é conhecido como espalhamento Rayleigh. Entretanto, uma pequena fração de luz incidente, aproximadamente um fóton em um milhão (0,0001%), será espalhado da amostra inelasticamente, e, portanto, com um comprimento de onda maior (anti-Stokes) ou menor (Stokes) do que o comprimento de onda original do laser (espalhamento Raman). Este processo de espalhamento inelástico da luz é conhecido como efeito Raman (SALA, 1995; SOARES, 2006).

Na Odontologia a espectroscopia Raman possui aplicações como no estudo da formação de fluoreto de cálcio no esmalte (TSUDA et al., 1993), no estudo de grau de

conversão de materiais resinosos (SOARES; LIPORONI; MARTIN, 2007) e na avaliação dos efeitos do Laser de Er:YAG na dentina (SOARES et al., 2007), dentre outras.

Os estudos aplicando a espectroscopia Raman para estudar a perda mineral por erosão no esmalte decíduo (GILCHRIST et al., 2007), no esmalte permanente (BRAGA et al., 2011) e dentina (SAKOOLNAMARKA et al., 2005; KARAN et al., 2009) são restritos.

Gilchrist et al. (2007) estudaram por espectroscopia micro-Raman as diferenças na concentração do fosfato entre áreas normais e áreas com erosão em esmalte decíduo e não encontraram diferenças estatísticas na área do pico do fosfato (960cm^{-1}) entre os dois tipos de esmalte.

Braga et al. (2011) em seu estudo avaliaram e compararam *in vitro* a morfologia e a composição mineral do esmalte do dente após o desafio erosivo no suco gástrico e suco de laranja. Os esmaltes de espécimes humanos foram submetidos ao desafio erosivo utilizando suco gástrico (a partir de exame de endoscopia) (n=10), e suco de laranja (comercialmente disponível) (n=10), durante 14 dias. Após a ciclagem, a perda de ácido foi determinada por espectroscopia atômica de emissão. A presença de carbonato (CO_3^{2-}) e fosfato (PO_4^{3-}) nos espécimes era avaliada antes e após o desafio erosivo por espectroscopia FT-Raman. A análise por espectroscopia de emissão atômica mostrou diferença estatisticamente significativa entre potencial erosivo de sucos ($P=0,0003$). A espectroscopia FT-Raman não encontrou diferença estatisticamente significativa na relação $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ após o desafio erosivo. A análise qualitativa por MEV mostrou alterações intensas de superfície do esmalte. O suco gástrico causa mais mudanças na morfologia e na composição mineral do esmalte dentário do que o suco de laranja. A espectroscopia de emissão atômica mostrou-se mais adequado para analisar a perda de pequena quantidade de mineral depois do desafio erosivo do que a espectroscopia FT-Raman.

A composição química da dentina em lesões cervicais não cariosas (causadas por erosão, abfração ou abrasão) foi estudada utilizando espectroscopia Raman (SAKOOLNAMARKA et al., 2005) e micro-Raman (KARAN et al., 2009). Sakoolnamarka et al. (2005) mostraram que os espectros Raman da dentina normal e afetada antes e depois do condicionamento ácido evidenciaram maiores concentrações do componente fosfato na dentina normal do que aquelas tratadas com ácido. No estudo de Karan et al. (2009), os espectros Raman e as imagens obtidas por mapeamento mostraram as alterações distintas de composição e estruturais em componentes minerais e na matriz da dentina afetada. Uma camada heterogênea hipermineralizada, com alta concentração de fosfato e baixo teor de

carbonato, alto grau de cristalinidade e colágeno parcialmente desnaturado foi revelada na dentina afetada das cavidades de lesões não cariosas.

A espectroscopia Raman permite a análise estrutural de amostras por identificar vibrações moleculares específicas induzidas pela luz (XU et al., 1997; SOARES; CAMPOS; MARTIN, 2013). Além disso, as intensidades relativas das bandas podem levar a estimativas semiquantitativas dos constituintes das amostras. Uma das vantagens distintas da técnica de espectroscopia Raman de outras técnicas analíticas é a capacidade de coletar informações tanto do componente mineral quanto do componente orgânico (colágeno) sem destruição da amostra ao final das medidas (SOARES; CAMPOS; MARTIN, 2013).

1.7.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV é uma técnica que permite a observação e análise de superfícies, por meio de imagens que se obtêm mediante um sistema optoeletrônico. O microscópio eletrônico é composto por um canhão eletrônico (lente eletrostática) onde se localiza o filamento emissor de elétrons, originados pelo aquecimento do filamento (emissão termoiônica) e de uma coluna composta de lentes eletromagnéticas por onde passam os elétrons que são acelerados por uma diferença de potencial que pode variar desde 5 até 1000 kV. A finalidade principal das lentes é a focalização e alinhamento do feixe de elétrons. Há necessidade de se ter vácuo no interior da coluna para que os gases ou moléculas não interfiram no caminho e nem diminuam a densidade de elétrons que irão interagir com a amostra.

O MEV possui características de operação importantes. Ele pode ser operado em uma escala ampla de aumentos, desde 10X até 100.000X. Seu alcance assim se estende desde aquele da lupa manual até o de um microscópio eletrônico de transmissão (MET). O MEV tem grande profundidade de foco. Como consequência, a topografia superficial de objetos sólidos pode ser examinada com grande facilidade, e as micrografias têm aspecto tridimensional. A técnica é ideal para estudar a topografia de superfície de objetos sólidos (GALLETI, 2003).

A análise por MEV tem grande aplicabilidade na odontologia em diversas áreas como, por exemplo, no estudo de processos de erosão na estrutura dental (SOARES et al., 2012) dentre outras.

No estudo de biomateriais esta técnica também é muito utilizada. Beuvelot et al. (2010) observaram através das análises por MEV a formação de nódulos mineralizados. Os SWCNT carboxilados permitiram a precipitação de calcosferitos redondos feitos de agulhas de HA, no caso semelhantes aos observados no tecido ósseo fetal. Marsi et al. (2012) observaram que os filmes de VAMWCNT-O₂ foram completamente recobertos com apatitas biológicas devido ao processo de biomineralização. Também verificaram por MEV a adesão de osteoblastos humanos aos VAMWCNT-O₂ biomineralizados, mostrando que os VAMWCNT-O₂ são candidatos privilegiados para a indução de mineralização de apatitas biológicas.

Diante das vantagens apresentadas pelas técnicas de análise mencionadas anteriormente e da ausência de estudos avaliando as alterações moleculares e morfológicas ocorridas na dentina (após procedimentos erosivos e aplicações de tratamentos preventivos), surge a motivação para novos estudos. Portanto, a espectroscopia Raman possibilita obter informações em nível molecular tanto da matriz mineral quanto da matriz orgânica na dentina erodida e sobre como os nanobiomateriais podem interferir neste processo. A análise por MEV complementa com informações sobre a morfologia de superfície da dentina.

2. OBJETIVOS

A seguir é exposto os objetivos desse estudo, tanto o geral quanto os específicos.

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi avaliar *in vitro*, os efeitos da aplicação de nanobiomateriais como compósitos de nanotubos de carbono/Grafeno (NTC/Grafeno), nanohidroxiapatita (nHAp) e flúor gel, bem como suas associações, em processos erosivos nos dentes.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar por espectroscopia FT-Raman, os efeitos na matriz orgânica e mineral da dentina após a aplicação de compósitos de NTC/Grafeno, nHAp, flúor gel e híbridos;
2. Avaliar por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV), as alterações morfológicas ocorridas na superfície da dentina radicular após a aplicação de compósitos de NTC/Grafeno, nHAp, flúor gel e híbridos e após a erosão;
3. Avaliar se os nanobiomateriais aplicados na dentina exercem algum efeito protetor frente à desmineralização causada por ácido cítrico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo seguem a descrição dos materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho bem como a ordem de preparação das amostras, tratamentos e análises realizadas.

3.1. Seleção dos dentes

Para a realização deste trabalho foram utilizados 21 dentes bovinos incisivos hígidos. Para a produção desta pesquisa seguiram-se os princípios éticos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme Resolução no 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba, sob o nº CEUA A04/2012 (ANEXO A).

3.2. Preparação das amostras

Após a limpeza e descontaminação dos dentes os mesmos foram seccionados utilizando-se uma máquina de corte de precisão (Isomet[®] 1000 – BUEHLER, Lake Bluff, IL, EUA) (Figura 5).

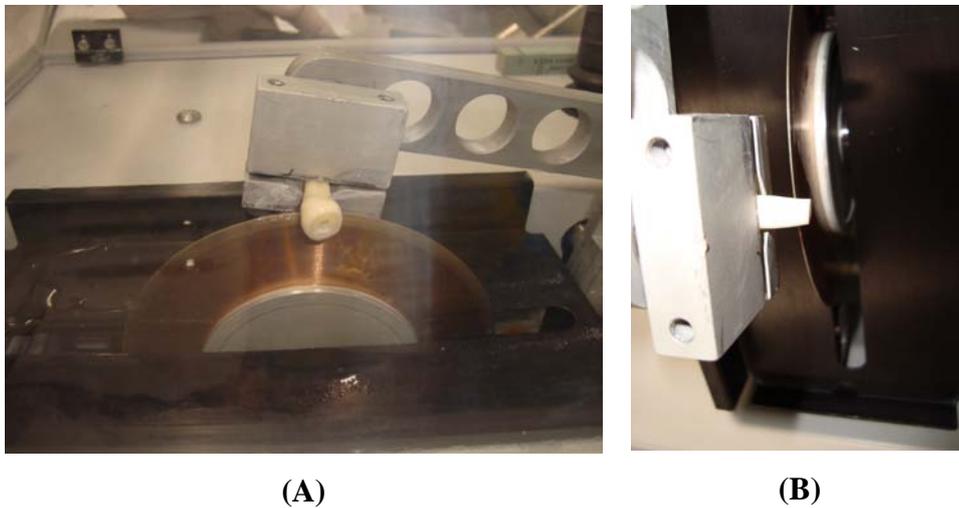
Figura 5: Máquina de corte de precisão utilizada na preparação das amostras.



Fonte: o autor.

O corte dos dentes foi realizado com refrigeração por água colocada em compartimento específico da máquina de corte. Para a realização do primeiro corte, o dente foi fixado no porta-amostras da máquina e com o disco diamantado separou-se a coroa da raiz (Figura 6A), utilizando-se um peso de 100g e uma velocidade de corte de 350rpm. Um segundo corte foi realizado, onde a amostra foi cortada ao meio e padronizou-se o tamanho da raiz para aproximadamente 8mm de comprimento (Figura 6B), obtendo então duas amostras de cada raiz (n=42).

Figura 6: Primeiro corte do dente separando-se a coroa da raiz (A). Segundo corte realizado na amostra para padronizar a medida (B).



(A)

(B)

Fonte: o autor.

Após este corte final, as superfícies vestibular e lingual da dentina radicular foram polidas em uma politriz refrigeradas a água (Figura 7) (MetaServ[®] 2000 BUEHLER, Lake Bluff, IL, EUA) com lixa d'água granulação n°600 e n°1500 (AROTEC[®], São Paulo, SP, Brasil) com uma velocidade de 150 rpm, para produzir uma superfície lisa, plana e homogênea.

Figura 7: Segundo corte realizado na amostra para padronizar a medida.



Fonte: o autor.

Cada amostra foi polida por aproximadamente 15 segundos em cada lixa, sendo que entre cada polimento as amostras foram lavadas e secas. Em seguida, tratamento de limpeza em cuba de ultrassom (MaxiClean-1450, Merse[®], Campinas, SP, Brasil) foi realizado em todas as amostras por 10 minutos. Ao final deste procedimento as amostras foram armazenadas individualmente em frascos onde cada uma recebeu uma numeração para dividi-las em 7 grupos de tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais.

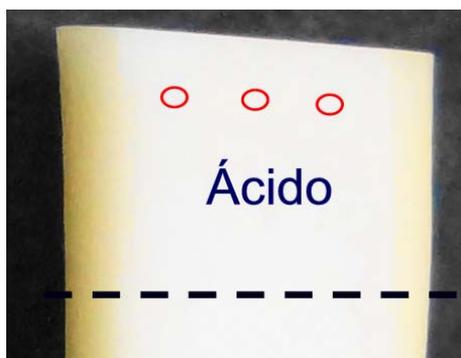
Grupos	Preparo de superfície	Tratamentos De Superfície	Desafio ácido
G1 (controle)		Sem tratamento	
G2	<i>Condicionamento com ácido fosfórico a 37% por 1 min.</i>	Flúor gel ácido	<i>Desmineralização:</i> suco de laranja
G3		nanohidroxiapatita (nHAp)	
G4		Compósito NTC/Grafeno	<i>Remineralização:</i> saliva artificial
G5		Flúor gel ácido + nHAp	
G6		Flúor gel ácido + NTC/Grafeno	
G7		Flúor gel ácido + NTC/Grafeno/nHAp	

Fonte: o autor.

3.3. Análise por espectroscopia FT-Raman

Após a etapa de preparação, em cada amostra foram coletados três na região tratada com ácido (Figura 8). A leitura inicial foi realizada no espectrômetro FT-Raman (RFS 100/S[®], Bruker, Inc., Karlsruhe, Alemanha) (Figura 9). Para a coleta dos espectros as amostras eram posicionadas no porta-amostras com o auxílio de uma massa de modelar (Figura 10). Na sequência o foco do laser na amostra era ajustado movimentando-se a amostra no eixo Z. A potência do laser de Nd:YAG (1064 nm) incidente na amostra foi de 200 mW. A resolução espectral foi ajustada para 4 cm⁻¹ com a utilização de 100 acumulações por espectro.

Figura 8: Figura esquemática da amostra de dentina ilustrando o posicionamento dos pontos onde os espectros foram coletados.



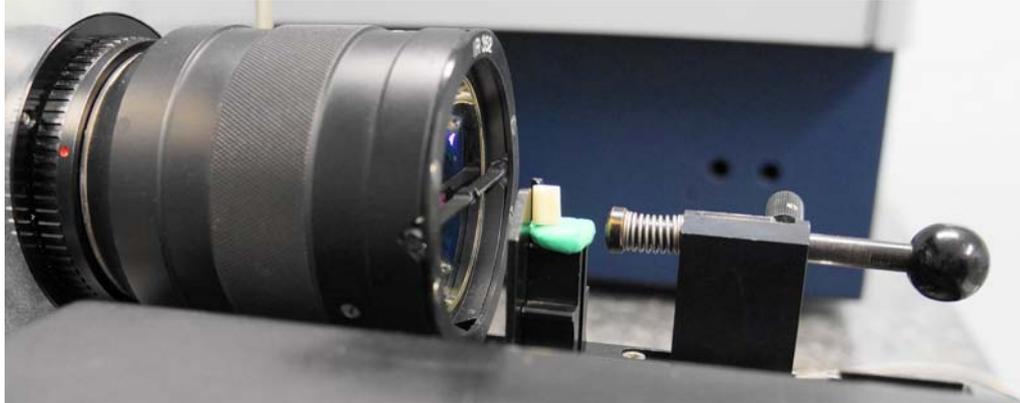
Fonte: o autor.

Figura 9: Espectrômetro FT-Raman utilizado no estudo.



Fonte: o autor.

Figura 10: Amostra posicionada no porta-amstras com o auxílio de uma massa de modelar.



Fonte: o autor.

3.4. Tratamentos iniciais

Inicialmente, todas as amostras foram tratadas com ácido fosfórico 37% (CONDAC 37, FGM, Joinville, SC) por 1 minuto (Figura 11A) seguido de lavagem com água corrente por 1 minuto (Figura 11B) de acordo com o protocolo prévio (AKASAKA et al., 2009).

Figura 11: Aplicação de ácido fosfórico a 37% (A); Lavagem em água corrente (B).



(A)



(B)

Fonte: o autor.

Esta aplicação foi feita em apenas metade da amostra, e para a lavagem, a amostra foi inclinada para que os resíduos de ácido não atingissem a outra parte do dente. Na seqüência, as amostras dos grupos 2, 5, 6 e 7 receberam uma aplicação de Flúor Fosfato Aciduladas

1,23% em gel por 4 minutos (DFL[®], DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a qual foi feita com um microbrush (Dentsply) (Figura 12) (MURAKAMI et al., 2009).

Após este período o produto foi removido com uma gaze e 30 minutos depois as amostras foram lavadas. Este intervalo de tempo foi preconizado para que fosse simulado o tempo que o paciente deve aguardar após a aplicação do flúor para ingerir água ou alimentos. Em seguida as amostras do grupo 2 foram novamente analisadas por Espectroscopia FT-Raman com os mesmos parâmetros das leituras anteriores para obter o espectro da dentina tratada somente com ácido e da dentina tratada com ácido e em seguida tratada com flúor.

Figura 12: Flúor gel acidulado (DFL) (A); Flúor gel aplicado sobre a dentina (B).



(A)



(B)

Fonte: o autor.

3.5. Preparação dos biomateriais

Nos grupos 3-7 foram utilizados biomateriais como a nHAp, o compósito NTC/Grafeno e o material híbrido (NTC/Grafeno/nHAp). Detalhes dos métodos de produção poderão ser visualizados nos trabalhos de Barbosa (2013) e Lobo et al. (2013a). Salienta-se que o método de produção do compósito NTC/Grafeno/nHAp trata-se de um novo material recentemente patenteado por Lobo et al. (2013b). Primeiramente, para a utilização do material híbrido que se apresentava na forma bruta (alta granulação, Figura 13A) realizou-se a maceração manual dos grãos com o auxílio de um gral e pistilo de cerâmica, até que os grânulos estivessem com aspecto fino e homogêneo (Figura 13B).

Figura 13: Compósito NTC/Grafeno/nHAp em sua forma granulada (A); Compósito NTC/Grafeno/nHAp em sua forma homogênea após trituração manual (B).



(A)



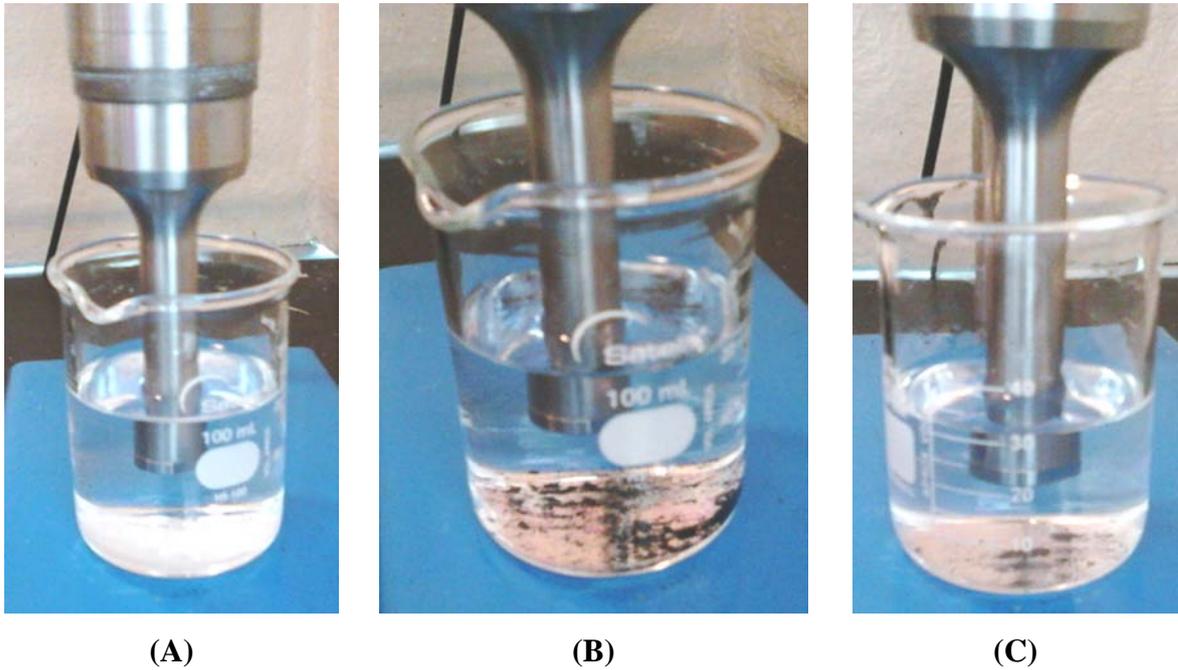
(B)

Fonte: o autor.

Para a aplicação dos nanobiomateriais foi utilizado o protocolo estabelecido por Akasaka et al. (2009) mas com adaptações para este estudo. Foi estabelecida uma massa de 0,0036 mg/mL de nHAp, do compósito NTC/Grafeno ou do compósito NTC/Grafeno/nHAp para 30 mL de água deionizada.

Para os grupos 3 e 5 pesou-se 0,0148 mg de HAp em balança de precisão com quatro casas decimais (Balança AUY 220, SHIMADZU), para os grupos 4 e 6 pesou-se 0,0156 mg do compósito NTC/Grafeno e para o grupo 7 pesou-se 0,0074 mg de do compósito NTC/Grafeno/nHAp. Ao final deste procedimento foi realizada a dispersão da nHAp (Figura 14A), do compósito NTC/Grafeno (Figura 14B) e do compósito NTC/Grafeno/nHAp (Figura 13C) em um Becker de vidro contendo 60 ml de água deionizada. Para a dispersão, a ponta do ultrassom foi inserida no Becker e uma amplitude de 40% foi aplicada durante 5 minutos (Figura 14). Entre cada processo de dispersão das soluções a ponta do ultrassom foi lavada em um Becker contendo álcool para evitar a contaminação da próxima solução.

Figura 14: Dispersão da nHAp (A); Dispersão do composto NTC/Grafeno (B) e Dispersão do do composto NTC/Grafeno/nHAp (C).



Fonte: o autor.

Após a preparação das soluções, cada compartimento de uma placa de cultura contendo uma amostra recebeu 3,0 ml de cada solução de acordo com o grupo de tratamento (Figuras 15-17).

Figura 15: Amostras em cada compartimento da placa contendo 3,0 ml de solução de nHAp (A); Placa tampada e identificada contendo as amostras dos grupos G3 e G5 (B).



Fonte: o autor.

Figura 16: Amostras em cada compartimento da placa contendo 3,0 ml de solução do compósito NTC/Grafeno (A); Placa tampada e identificada contendo as amostras dos grupos G4 e G6 (B).



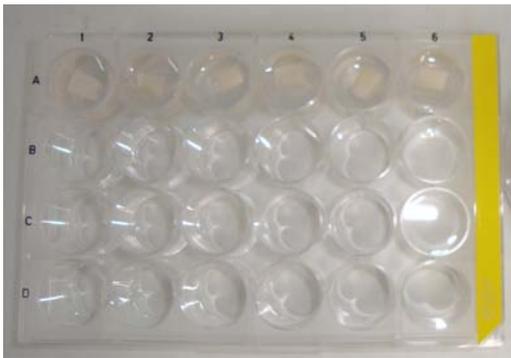
(A)



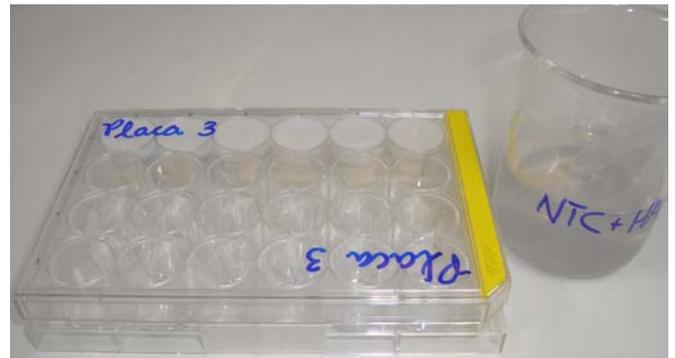
(B)

Fonte: o autor.

Figura 17: Amostras em cada compartimento da placa contendo 3,0 ml de solução do compósito NTC/Grafeno/nHAp (A), placa tampada e identificada contendo as amostras do grupo G7 (B).



(A)



(B)

Fonte: o autor.

As três placas contendo as amostras dos grupos G3-G7 foram inseridas no interior uma incubadora refrigerada de piso “shaker” (CT-713RT, Cientec[®], Cientec Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) para agitação por 1h em uma temperatura de 36,6 °C com velocidade de 75 RPM (Figura 18).

Figura 18: Placas contendo as amostras dos grupos G3-G7 inseridas no interior uma incubadora refrigerada de piso (A); Painel indicando ajustes de temperatura e velocidade (B).



Fonte: o autor.

Após 1 hora de agitação, as soluções remanescentes foram novamente dispersadas no ultrassom, o conteúdo das soluções em cada compartimento de cada placa foi renovado e as placas submetidas a novo período de agitação (1 h) nas mesmas condições anteriores. No final do período, cada amostra foi lavada três vezes com água deionizada (AKASAKA et al., 2009) e armazenadas em frascos individuais numerados. Em seguida as amostras dos grupos 3-7 foram novamente analisadas por Espectroscopia Raman com os mesmos parâmetros das leituras anteriores.

3.6. Ciclagem erosiva

A ciclagem erosiva consistiu em imergir as amostras de dentina radicular bovina em suco de laranja. Os dentes foram submetidos a seis ciclos de des-remineralização com as respectivas soluções: suco de laranja (Minute Maid Mais Laranja Caseira[®], 67% suco natural, pH 3,67) e saliva artificial (Nostra Formula, Farmácia de Manipulação). Cada ciclo foi realizado seguindo o protocolo utilizado por Lima et al. (2010) e Carvalho Filho et al. (2011).

Dessa forma, os frascos contendo individualmente as amostras imersas em suco de laranja foram então vedados com fita PARAFILMM, colocados em um agitador magnético (Modelo 752A, FISATOM, Fisatom Equipamentos Científicos, São Paulo, SP, Brasil) e submetidos a

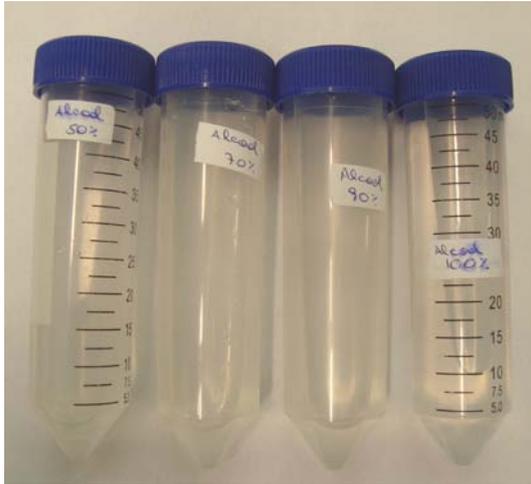
suave agitação. Cada etapa de imersão em suco de laranja durou 10 minutos. Os fragmentos de raízes foram então lavados com água destilada por 30 segundos e armazenados em frasco com saliva artificial após a conclusão de cada ciclo desmineralizador por 1h à temperatura de 37°C em estufa de cultura. Em cada ciclo as amostras foram imersas nas respectivas soluções por 10 minutos sendo devolvidas para saliva artificial por 1 hora. A cada troca de recipiente contendo suco de laranja ou saliva artificial, as amostras foram lavadas em água destilada e secas com gaze estéril com o objetivo de evitar a contaminação das respectivas soluções. Após cada ciclo, o suco era descartado e renovado.

3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão (MEV e MET)

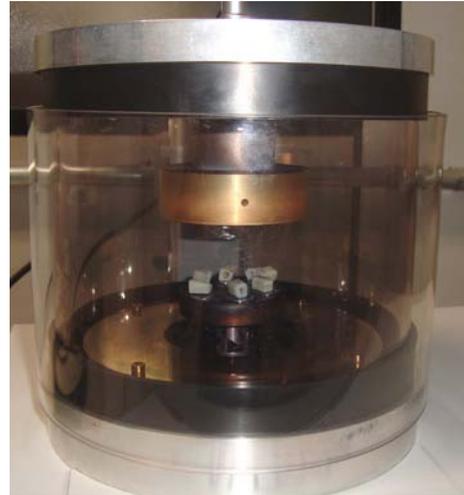
Para a realização da análise por MEV foi selecionada uma amostra de cada grupo antes e depois da etapa erosiva (n = 14). A preparação das amostras consistiu de desidratação em série graduada de álcool nas concentrações de 30, 50 e 70% (15 min), 90% (30 min.) e 100% (1 h) (Figura 19 A). Após, as amostras foram secas em dissecador à vácuo e estufa a 37°C e metalizadas com camada de ouro em metalizadora (Figura 19 B).

Em seguida as amostras foram avaliadas no MEV (EVO-MA10, Carl STM Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com uma aceleração de voltagem de 20 kV. As micrografias foram capturadas com um aumento de 5000x para verificar a morfologia da dentina e dos túbulos dentinários na busca da deposição de algum material ou camada. Também foi realizada a caracterização dos nanobiomateriais por MEV e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para a análise MET (JEOL 3010) utilizou-se como parâmetros 300 kV e 120 mA, utilizando um filamento LAB6. Para as análises, os compósitos de NTC/grafeno+nHAp foram dispersos em água e gotejados sobre grades de cobre cobertas com filme de carbono.

Figura 19: Série graduada de álcool para desidratação das amostras (A); Amostras em processo de metalização (B).



(A)



(B)

Fonte: o autor.

3.8. Análise dos dados

Após a coleta dos espectros foi feita a média dos 3 pontos para cada amostra. Em seguida foram realizados os procedimentos de normalização dos espectros, seleção da área de interesse e ajuste da linha de base. Estas médias e o processamento dos espectros foram feitos no programa Opus[®] (v. 4.2, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanha).

Para a análise qualitativa e semiquantitativa dos componentes foi feita a linha de base dos espectros e a normalização pelo pico em 1450 cm^{-1} (XU, WANG, 2012). As alterações nos componentes orgânico e inorgânico da dentina foram avaliadas pela comparação das áreas relativas das bandas Raman em 960 , 1071 e 2942 cm^{-1} entre os grupos de tratamentos. O cálculo de todas as áreas foi realizado no programa Microcal Origin 5.0[®] (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, EUA).

Após o cálculo das áreas das bandas, realizou-se então uma análise de variância multifatorial (ANOVA) com intervalo de confiança de 95% para verificar as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados. Os resultados indicaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados ($p < 0,05$). Para as comparações dos componentes da dentina, entre tratamentos e grupos aplicou-se o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas pareadas. Todas as comparações estatísticas foram realizadas no programa ezANOVA[®] (v. 0.98).

4. RESULTADOS

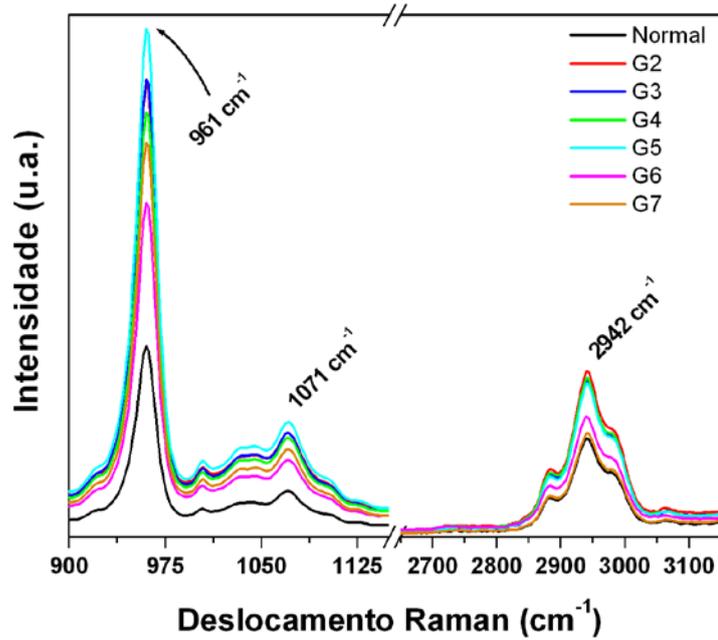
A seguir são apresentados os resultados obtidos.

4.1. Espectroscopia FT-Raman

A figura 20 apresenta o espectro Raman médio sobreposto das amostras de dentina após a aplicação dos biomateriais indicando as bandas do componente fosfato ($\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, 961 cm^{-1}), carbonato ($\nu_1\text{CO}_3^{2-}$, 1071 cm^{-1}) e material orgânico (CH_2 , 2942 cm^{-1}) (SOARES et al., 2009) comparado com o espectro da dentina sem tratamento (Normal), onde observam-se as maiores intensidades para os grupos 2, 3 e 5. A figura 21 apresenta o espectro Raman médio para os grupos depois da ciclagem erosiva com a maior intensidade encontrada no grupo 5. Nas figuras 22 e 23 observa-se a presença da banda G1' em 2570 cm^{-1} referente aos MWCNT (ANTUNES et al., 2006) antes e depois da erosão, respectivamente.

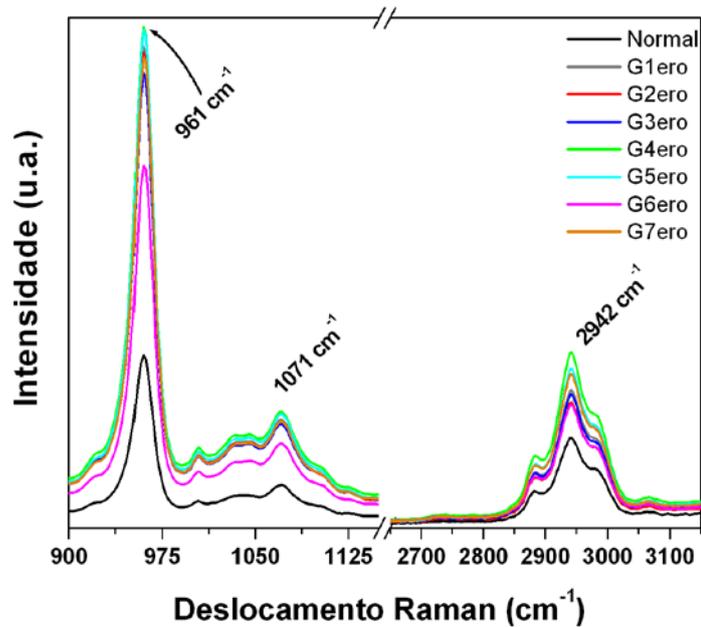
Após a realização das leituras pontuais, das médias e do processamento dos espectros, os dados foram tabulados e apresentados nas figuras 24-32. Para a realização dos cálculos das áreas das bandas, todos os espectros foram normalizados pela banda em 1450 cm^{-1} (XU; WANG, 2012). Para o componente fosfato ($\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, 961 cm^{-1}), nas comparações estatísticas entre o grupo controle (G1) sem nenhum tratamento e os grupos que receberam os biomateriais não foram verificadas diferenças estatísticas significantes ($p>0,05$) (Figura 24). Comparando-se cada grupo com as leituras antes e após a erosão (e) também não foram observadas diferenças estatísticas significantes na banda referente ao fosfato ($p>0,05$) (Figura 24). Nas comparações entre os grupos sem flúor (Figura 25) e com aplicação prévia de flúor (Figura 26), também não foram observadas diferenças estatísticas para esta banda ($p>0,05$).

Figura 20: Espectros FT-Raman da dentina bovina para os grupos de tratamento após a aplicação dos biomateriais comparado com grupo sem tratamento (Normal).



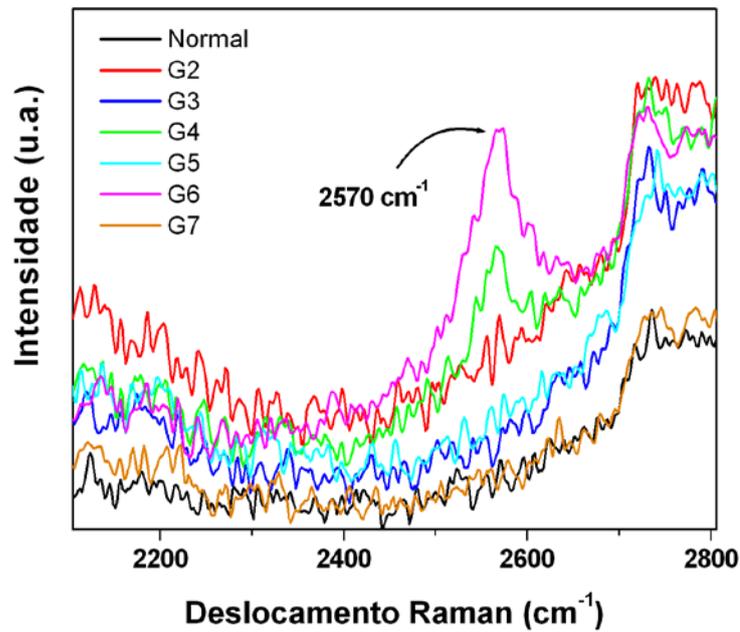
Fonte: o autor.

Figura 21: Espectros FT-Raman da dentina bovina para os grupos de tratamento após a aplicação dos biomateriais seguido da erosão comparado com grupo sem tratamento (Normal).



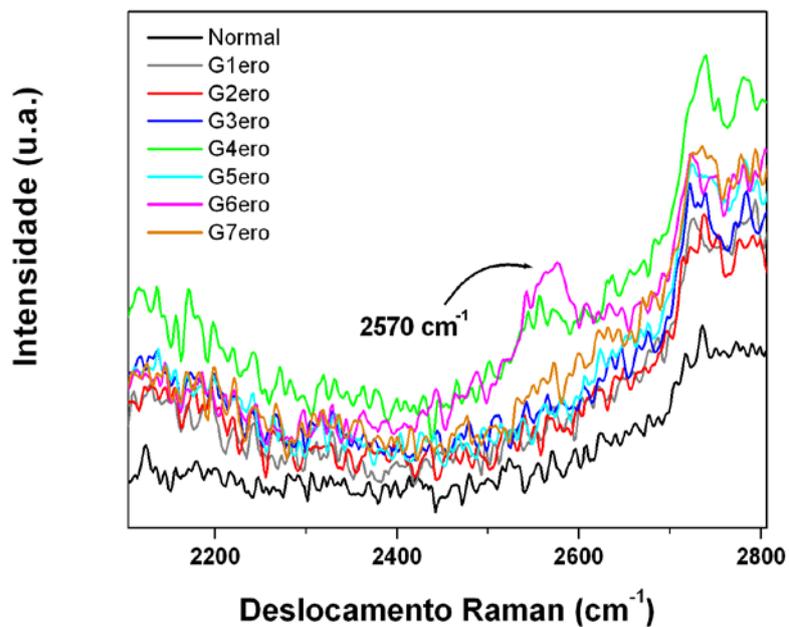
Fonte: o autor.

Figura 22: Espectros FT-Raman da dentina bovina para os grupos de tratamento após a aplicação dos biomateriais comparado com grupo sem tratamento (Normal) evidenciando a região da banda G1' em 2570 cm^{-1} .



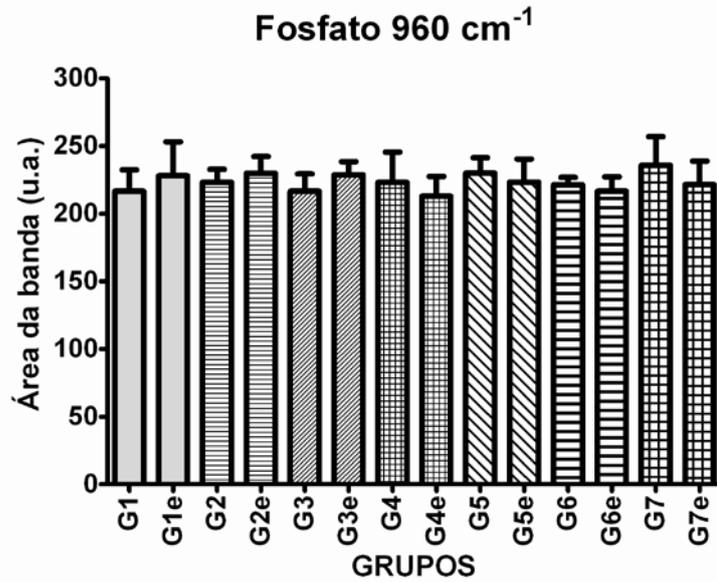
Fonte: o autor.

Figura 23: Espectros FT-Raman da dentina bovina para os grupos de tratamento após a aplicação dos biomateriais seguido de erosão comparado com grupo sem tratamento (Normal) evidenciando a região da banda G1' em 2570 cm^{-1} .



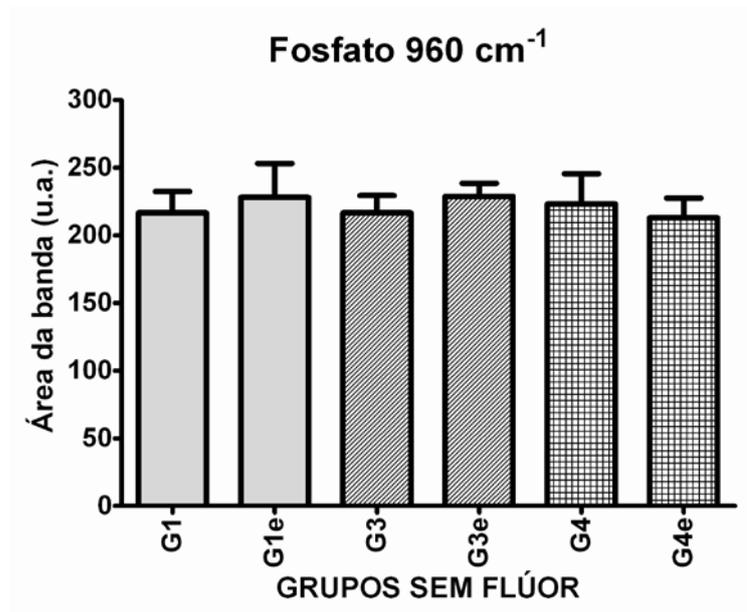
Fonte: o autor.

Figura 24: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 960 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos de tratamento.



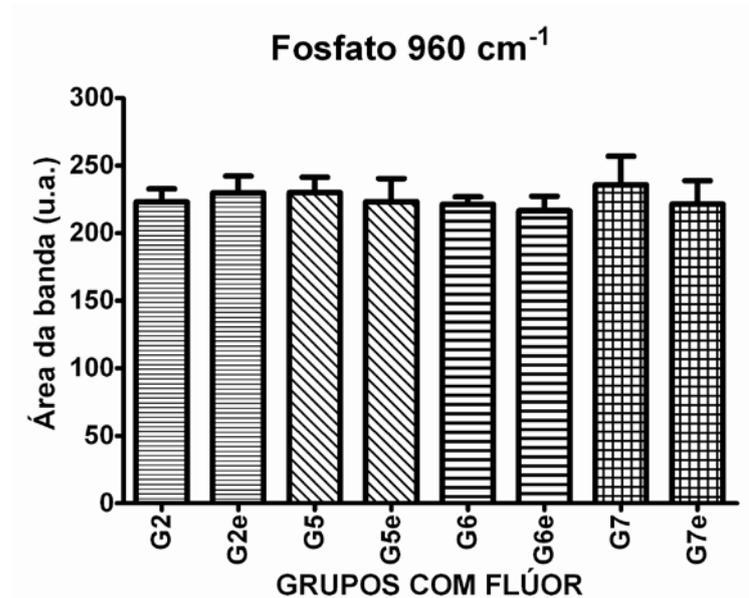
Fonte: o autor.

Figura 25: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 960 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos sem aplicação prévia de flúor.



Fonte: o autor.

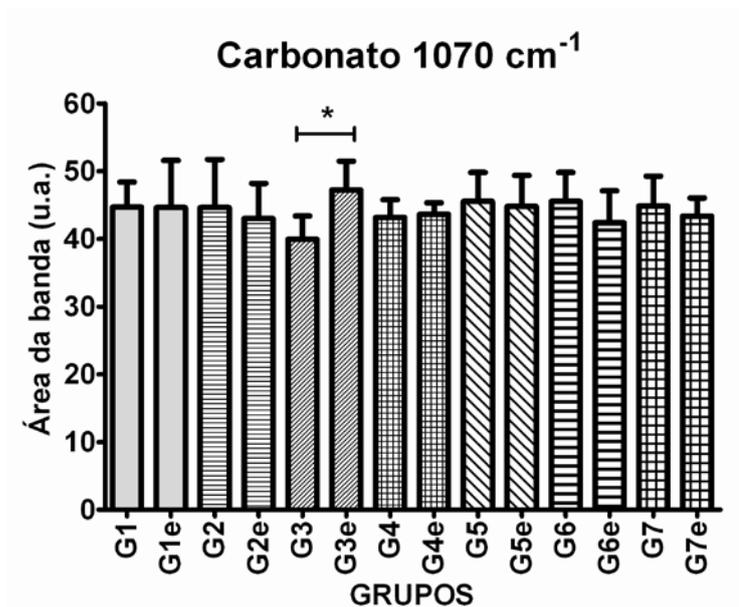
Figura 26: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 960 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos com aplicação prévia de flúor.



Fonte: o autor.

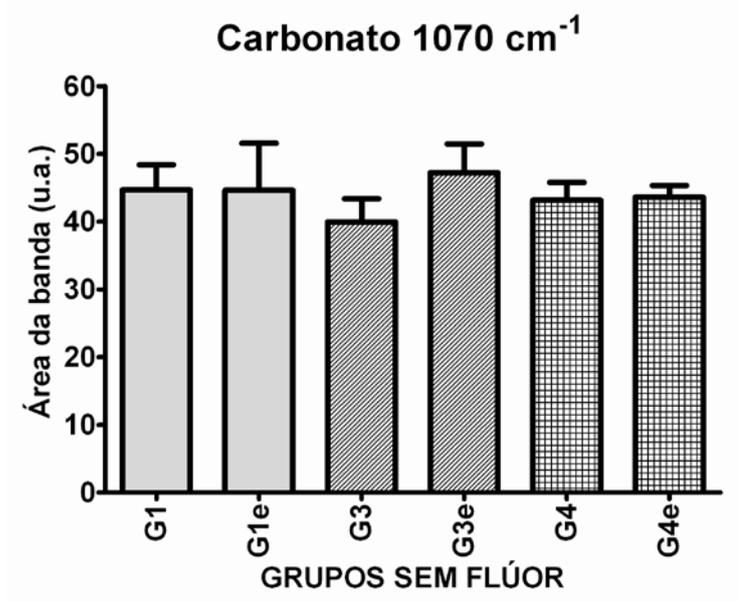
Para o componente carbonato ($\nu_1\text{CO}_3^{2-}$, 1071 cm^{-1}), nas comparações estatísticas entre o grupo controle (G1) sem nenhum tratamento e os grupos que receberam os biomateriais não foram verificadas diferenças estatísticas significantes ($p>0,05$) (Figura 27). Comparando-se cada grupo nas leituras antes e após a erosão (e), diferenças estatísticas significantes foram encontradas para o carbonato após a erosão nas amostras do grupo 3 ($p<0,05$), com aumento na área da banda (Figura 27, asterisco). Nas comparações entre os grupos sem flúor (Figura 28) e com aplicação prévia de flúor (Figura 29), não foram observadas diferenças estatísticas para esta banda ($p>0,05$).

Figura 27: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 1070 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos de tratamento. As diferenças estatísticas significativas são representadas pelo asterisco (*).



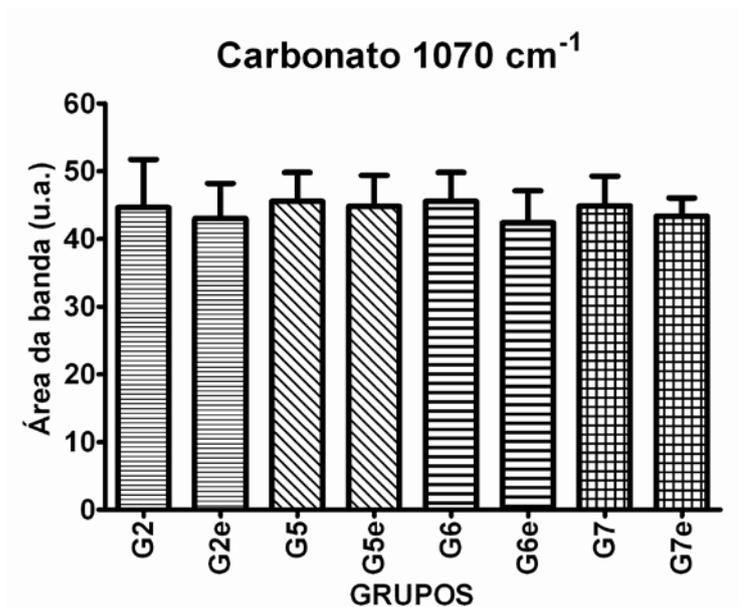
Fonte: o autor.

Figura 28: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 1070 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos sem aplicação prévia de flúor.



Fonte: o autor.

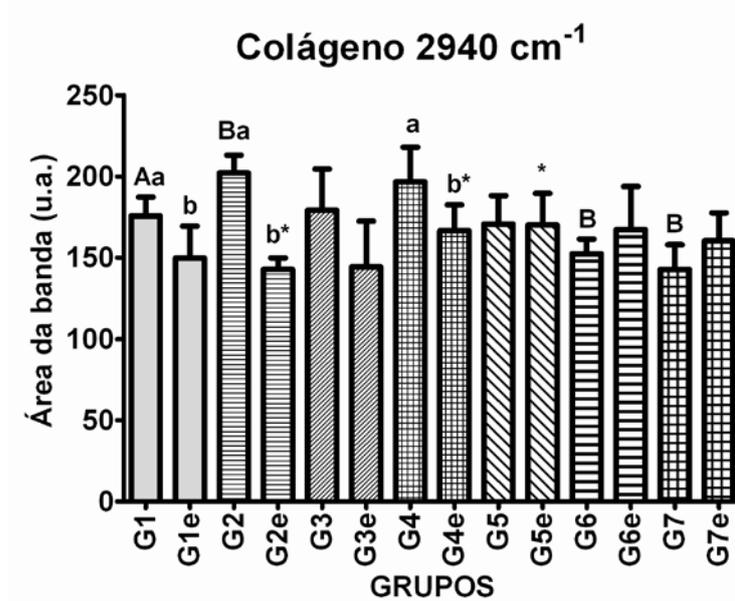
Figura 29: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 1070 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos com aplicação prévia de flúor.



Fonte: o autor.

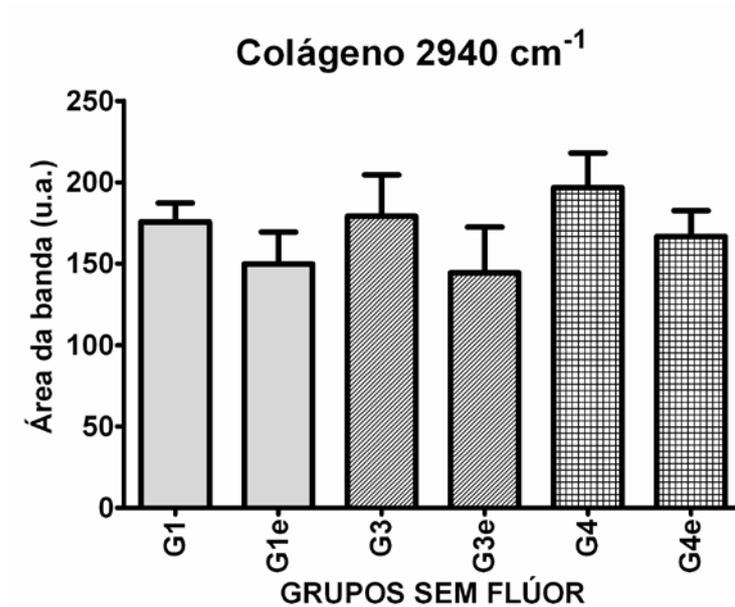
Para o componente orgânico (ligações C-H do colágeno), nas comparações estatísticas entre o grupo controle (G1) sem nenhum tratamento e os grupos que receberam os biomateriais foram verificadas diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) para os grupos 2, 6 e 7 (Figura 30, letras maiúsculas diferentes) com uma área de banda maior para o G2 e menor em G6 e 7. Comparando-se cada grupo nas leituras antes e após a erosão (e), diferenças estatísticas significantes foram encontradas para o colágeno após a erosão nas amostras dos grupos 1, 2 e 4 ($p < 0,05$) (Figura 31, letras minúsculas diferentes). Ainda, foram observadas diferenças significantes ($p < 0,05$) após a erosão entre o grupo tratado com flúor (G2) e os grupos 4 e 5 (Figura 31, asteriscos). Nas comparações entre os grupos sem aplicação prévia de flúor (Figura 31), não foram observadas diferenças estatísticas para esta banda ($p > 0,05$).

Figura 30: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 2940 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos de tratamento. As diferenças estatísticas significativas são representadas por: letras maiúsculas diferentes para comparações entre o controle e os grupos com biomateriais antes da erosão, letras minúsculas diferentes para comparações em um mesmo grupo antes e após a erosão, diferenças significativas entre o grupo 2 e os grupos 4 e 5 são representadas pelo asterisco (*).



Fonte: o autor.

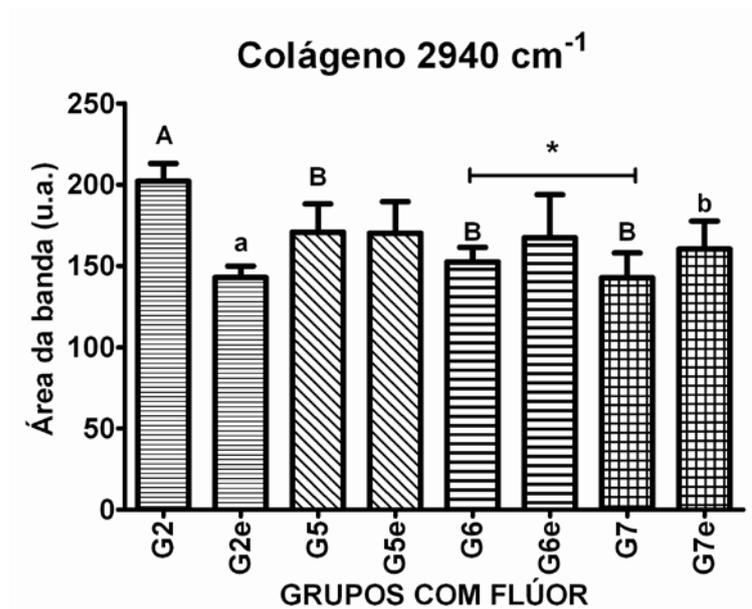
Figura 31: Média e desvio padrão (n=5) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 2940 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos sem aplicação prévia de flúor.



Fonte: o autor.

Nas comparações entre os grupos com aplicação prévia de flúor (Figura 32), foram observadas diferenças estatísticas para o colágeno ($p < 0,05$) entre os grupos antes da erosão (letras maiúsculas diferentes), entre o grupo 2 e 7 após a erosão (letras minúsculas diferentes) e entre os grupos 6 e 7 antes da erosão (asterisco).

Figura 32: Média e desvio padrão ($n=5$) dos valores das áreas relativas (unidade arbitrária – u.a.) da banda com deslocamento Raman em 2940 cm^{-1} , obtidos por espectroscopia FT-Raman, para os grupos com aplicação prévia de flúor. As diferenças estatísticas significantes são representadas por: letras maiúsculas diferentes para comparações entre o grupo 2 (flúor) e os grupos com biomateriais antes da erosão, letras minúsculas diferentes para comparações entre os grupos após a erosão, diferenças significantes entre os grupos 6 e 7 antes da erosão são representadas pelo asterisco (*).



Fonte: o autor.

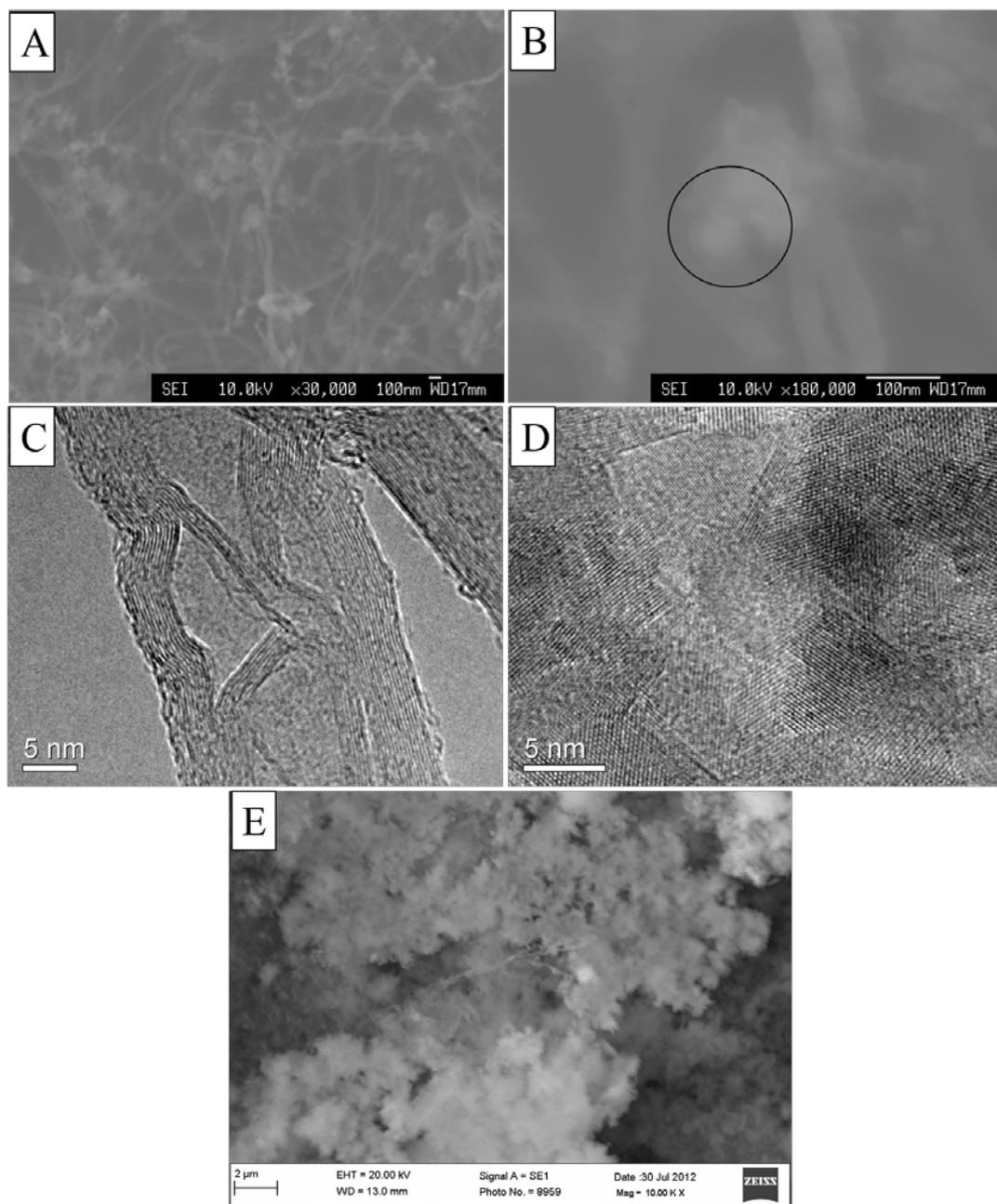
4.2 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 33 (A-E) ilustra os detalhes morfológicos e estruturais dos nanocompósitos. A Figura 33A mostra a morfologia típica de compósitos NTC/grafeno. A Figura 33B mostra folhas de grafeno (círculo) e NTC em torno deles. Os NTC tem estrutura cristalina na forma de bambu com um diâmetro médio de 30 nm (Figura 33C). A Figura 33D mostra aglomerados de folhas de grafeno e estrutura na forma de bambu de NTC. A Figura 33E mostra detalhes do composto NTC/grafeno + nHAp.

Nas figuras 34-36 são apresentadas as micrografias de superfície da dentina radicular bovina com aplicação prévia de ácido fosfórico, submetidas à aplicação dos biomateriais e em seguida à ciclagem erosiva. No grupo 1, antes e após a armazenagem em saliva, observa-se o

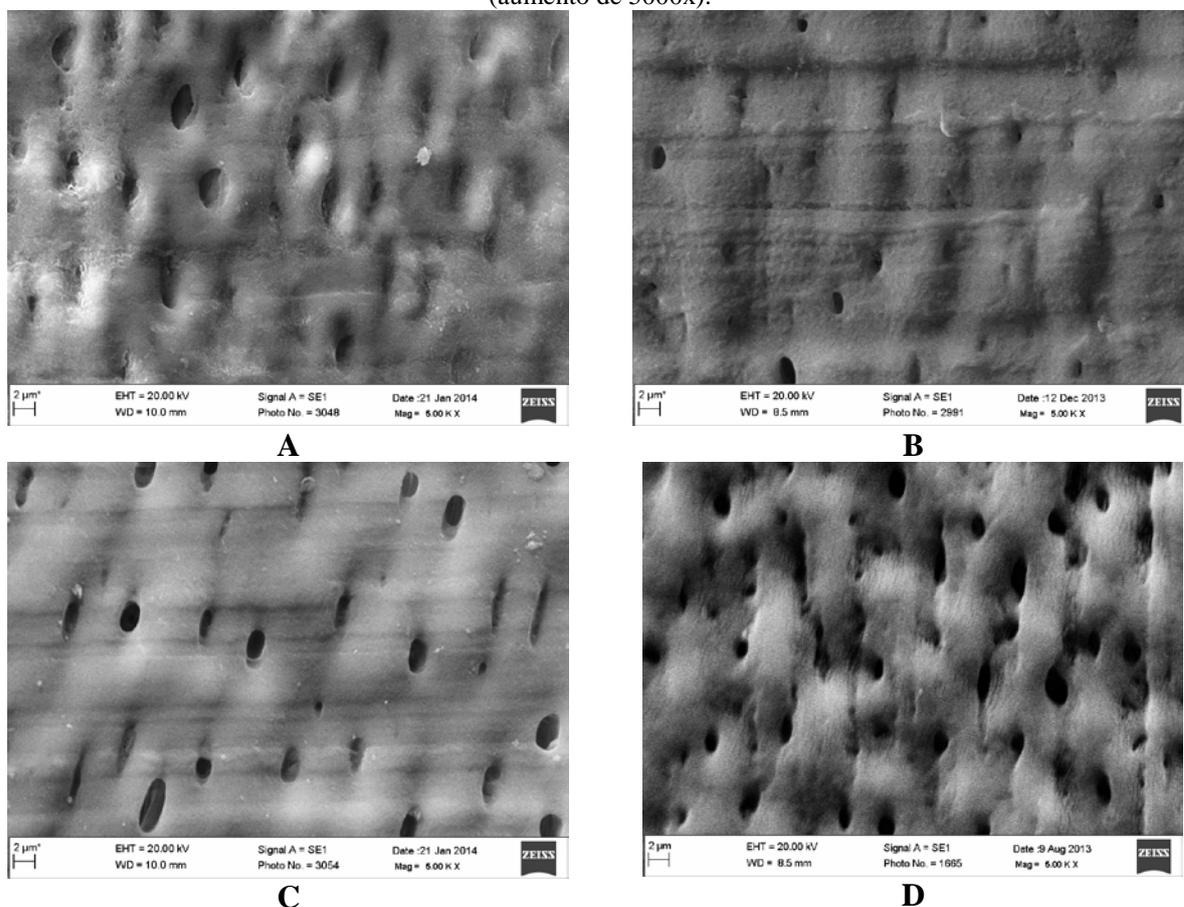
elevado número de túbulos dentinários totalmente ou parcialmente ocluídos e distribuídos homogeneamente pela superfície da dentina (Figuras 34 A, B). No grupo 2, onde as amostras receberam aplicação de flúor gel ácido, observa-se uma superfície com túbulos dentinários abertos e parcialmente ocluídos antes da erosão (Figura 34 C). Após procedimentos de des-remineralização observa-se um maior número de túbulos dentinários expostos (Figura 34 D).

Figura 33: Micrografias obtidas dos nanobiomateriais produzidos: compósito NTC/Grafeno (A); detalhes das folhas de grafeno (B); Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrando os NTC em forma de bambu (C) e aglomerados de folhas de grafeno (D); Micrografia obtida por MEV do composto NTC/grafeno+nHAp (E).



Fonte: o autor.

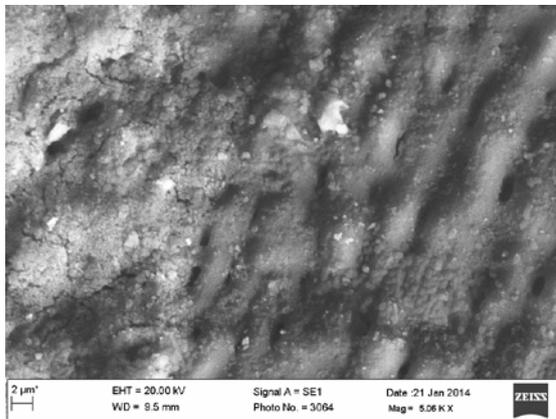
Figura 34: Micrografias obtidas da superfície da dentina normal com aplicação prévia de ácido fosfórico. Superfície da dentina antes e depois da ciclagem erosiva dos grupos: G1 – saliva artificial antes da erosão (A); Após a erosão (B); G2 – flúor fosfato acidulado (FG) em gel, 1 min antes da erosão (C); Após a erosão (D) (aumento de 5000x).



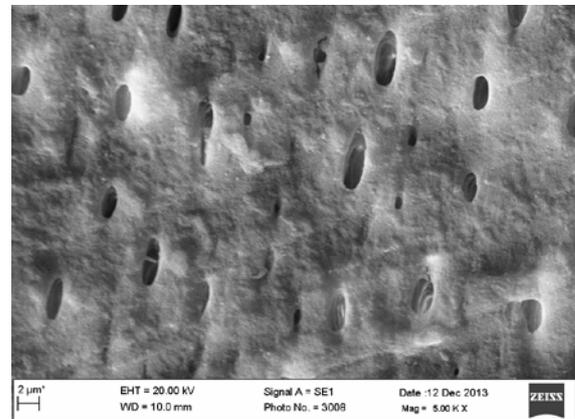
Fonte: o autor.

No grupo 3, onde as amostras foram tratadas com nHAp, é possível observar túbulos dentinários totalmente ocluídos por uma camada granular de nHAp antes da ciclagem (Figura 35 A) e túbulos abertos e outros parcialmente ou totalmente ocluídos após a ciclagem (Figura 35 B). No grupo 4, após tratamento com compósito NTC/Grafeno verifica-se um grande número de túbulos dentinários totalmente ocluídos, entretanto sem a presença de NTC aderidos na superfície (Figura 35 C). Depois da ciclagem erosiva, é possível notar na dentina a deposição uma fina malha de NTC ocluindo os túbulos dentinários (Figura 35 D).

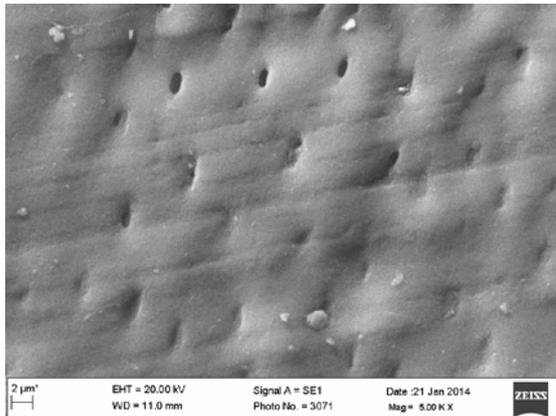
Figura 35: Micrografias obtidas da superfície da dentina normal com aplicação prévia de ácido fosfórico. Superfície da dentina antes e depois da ciclagem erosiva dos grupos: G3 – nanohidroxiapatita (nHAp) antes (A); após a erosão (B); G4 – Compósito Nanotubos de carbono (NTC)/Grafeno antes da erosão (C); após a erosão (D) (aumento de 5000x).



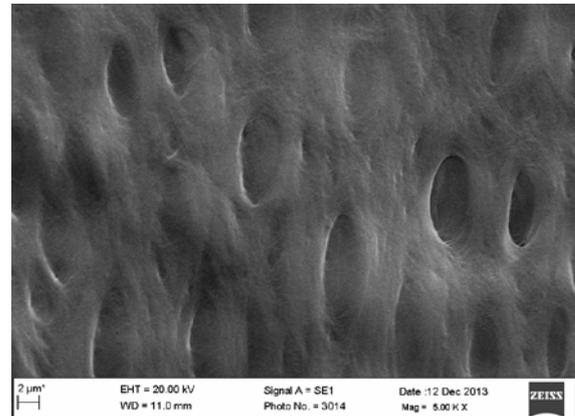
A



B



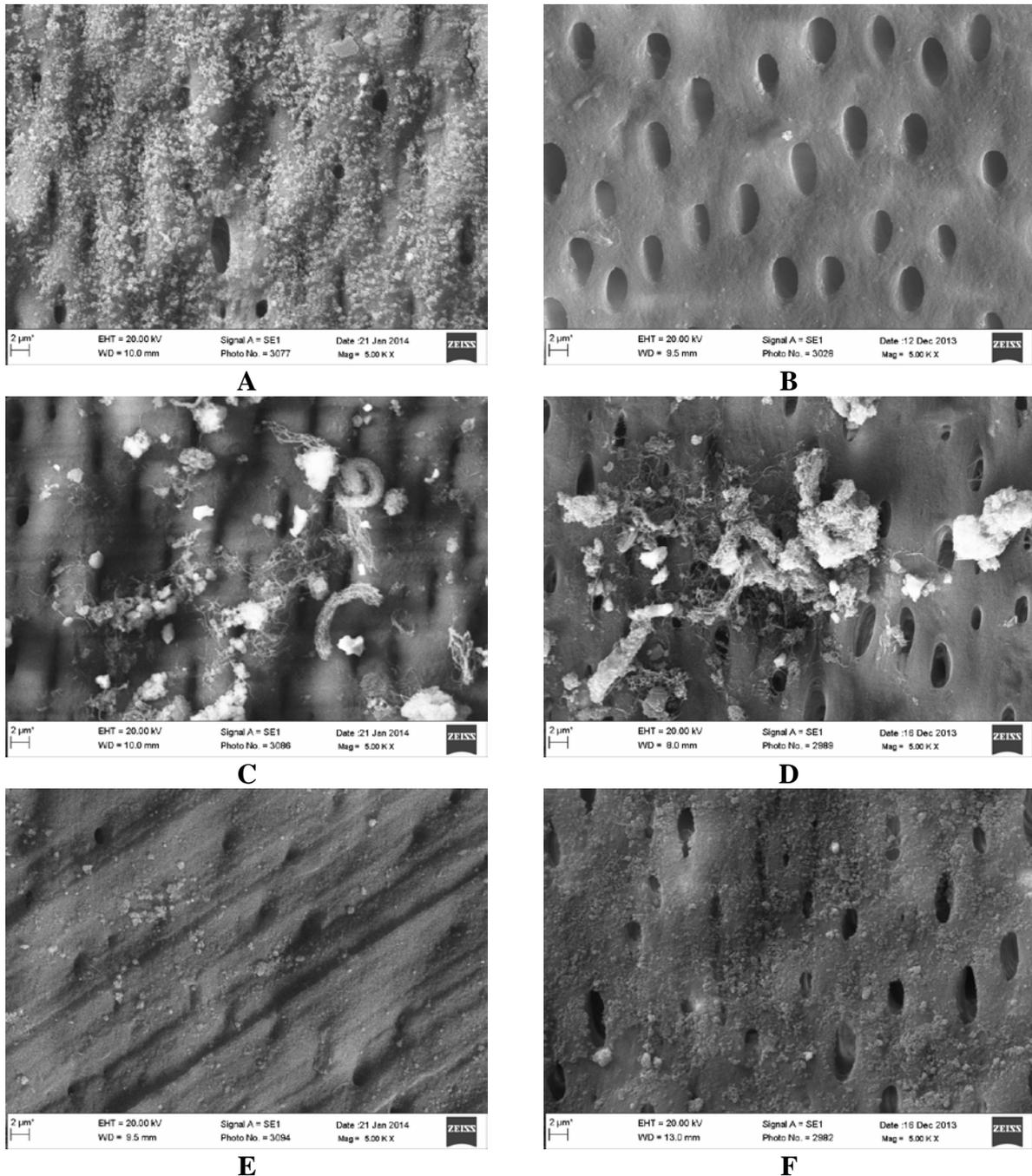
C



D

Fonte: o autor.

Figura 36: Micrografias obtidas da superfície da dentina normal com aplicação prévia de ácido fosfórico. Superfície da dentina antes e depois da ciclagem erosiva dos grupos: G5 – FG + nHAp antes da erosão (A); Após a erosão (B); G6 – FG + compósito NTC/Grafeno antes da erosão (C); Após a erosão (D); G7 - FG + compósito NTC/Grafeno/nHAp antes da erosão (E); Após a erosão (F) (aumento de 5000x).



Fonte: o autor.

Na superfície da dentina do grupo 5, onde as amostras foram tratadas com flúor gel e nHAp, é visível a deposição de fina camada de grânulos de nHAp (Figura 36 A). Após a

ciclagem verifica-se que os túbulos dentinários encontram-se totalmente abertos (Figura 36 B). No grupo 6, onde as amostras foram tratadas com flúor gel e compósito NTC/Grafeno, é visível a presença de uma camada não homogênea de NTC/Grafeno formando enovelados/aglomerados, antes e após a ciclagem, onde alguns túbulos dentinários foram ocluídos (Figuras 36 C, D). Na superfície da dentina do G7, com tratamento por flúor gel e compósito de NTC/Grafeno/nHAp (Figuras 36, E, F), é visível uma deposição de cristais na dentina antes da erosão (Figura 36 E) onde alguns túbulos dentinários permaneceram ocluídos após a ciclagem erosiva (Figura 36 F).

5. DISCUSSÃO

O estudo da aplicação de NTC em odontologia é importante, pois o crescente desenvolvimento de novos materiais odontológicos e de novos biomateriais abre portas para pesquisas utilizando nanobiomateriais que possam realizar a mineralização ou a proteção da estrutura dental em processos erosivos.

A avaliação da erosão em dentina foi escolhida pela questão da exposição dos túbulos dentinários em lesões cervicais não cariosas (LCNC) de grande incidência na população, onde na dentina exposta ocorre a movimentação do fluido intratubular mediante estímulos gerando a sensibilidade dolorosa. Outro fator é a afinidade que os NTC possuem pelo colágeno e consequentemente pela dentina, devido à sua elevada porção orgânica, fato este observado por Akasaka et al. (2009) onde o mesmo não verificou afinidade dos NTC ao esmalte dental. Portanto delimitou-se neste estudo apenas a dentina como substrato dental de avaliação. A aplicação NTC em dentina é um campo novo a ser explorado e existe apenas um estudo que comenta superficialmente a questão (AKASAKA et al., 2009).

O método mais tradicional utilizado para a proteção ou remineralização da dentina é a aplicação de produtos fluoretados. A aplicação tópica de flúor cria uma barreira por precipitar CaF_2 na superfície do dente, bloqueando a entrada dos túbulos dentinários e assim reduzindo a permeabilidade e a hipersensibilidade (RITTER et al., 2006).

Vestígios de flúor na saliva são eficazes na mudança do equilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização. Isto é atribuído à precipitação melhorada de fosfato de cálcio pelo fluoreto e a formação de flúorhidroxiapatita em tecidos dentais. A flúorapatita é menos solúvel em soluções ácidas do que a HAp, que por sua vez é menos solúvel do que apatitas carbonatadas (GJORGIEVSKA et al., 2013).

A figura 33 mostra a presença do compósito NTC/Grafeno produzido pelo método com condicionamento por plasma de oxigênio (Figura 33 A-D). Esta metodologia esfolia as pontas dos NTC, expondo assim a estrutura do grafeno (LOBO et al, 2013a). As pontas são a porção mais defeituosa dos NTC, pois elas são as partes mais sensíveis ao condicionamento. Primeiramente, foram observados vários NTC com corrosão das pontas. Isto é devido à presença de mais defeitos devido às pontas de nanotubos fechadas e, consequentemente, uma ligação covalente de baixa energia entre os átomos de C-C. Além disso, o tratamento com plasma de oxigênio incorporou grupos carboxílicos sobre as paredes do NTC que favorecem a cristalização acicular da nHAp e grandes quantidades de precipitado (LOBO et al, 2013a). A

morfologia típica do compósito NTC/Grafeno/nHAp revela a excelente interação entre os três componentes do compósito (Figura 33E).

No presente estudo verificou-se que o tratamento da dentina com NTC (G4), flúor associado aos NTC (G6) e com a associação de flúor e compósito NTC/Grafeno/nHAp (G7) são as melhores opções de tratamento para ocluir a abertura dos túbulos dentinários como método preventivo em processos erosivos (Figuras 34 e 35) se comparado aos outros tratamentos. Esta deposição homogênea por toda a superfície da dentina com oclusão dos túbulos evidencia o potencial destes biomateriais para o tratamento da sensibilidade dentinária devido à exposição dos túbulos dentinários na porção radicular do elemento dental. Estes resultados corroboram com outros estudos que mostram a oclusão de túbulos dentinários por deposição de partículas de nHAp (BESINIS; VAN NOORT; MARTIN, 2012; YUAN et al., 2012). Entretanto, no caso da dentina tratada com a associação de flúor gel e NTC houve um envelhecimento dos NTC formando aglomerados. Este resultado é devido à reação do íon flúor com carga negativa ocorrendo atração pelos NTC (Figuras 35 C, D).

Sabe-se que a quantidade de fluido circulando no interior dos túbulos dentinários é proporcional à quarta potência do diâmetro dos túbulos dentinários (YUAN et al., 2012). As características da superfície da dentina determinam 86% da sua resistência ao escoamento do fluido tubular. Portanto, uma ligeira redução do diâmetro dos túbulos dentinários pode reduzir significativamente o fluxo do líquido dentro dos túbulos dentinários e conseqüentemente aliviar a sensibilidade do nervo (YUAN et al., 2012).

Neste estudo foi utilizada água destilada para a dispersão dos biomateriais. Besinis, Van Noort e Martin (2012) em seu estudo verificaram uma maior infiltração (na dentina desmineralizada) da nHAp diluída em acetona do que a diluída em água. Já Huang, Gao e Yu (2009) verificaram que a concentração ideal para a remineralização de cáries incipientes em esmalte é de 10% de nHAp em suspensão em água destilada.

Assim evidencia-se que, a aplicação de NTC e da associação positiva do compósito NTC/Grafeno/nHAp com o flúor, apresenta uma aplicação clínica vasta, podendo ser adicionado à formulação de cremes dentais, enxaguatórios bucais, saliva artificial ou outro tipo de veículo. Estudos adicionais são necessários para verificar a estabilidade desta camada de depósitos frente a situações como a ação da escovação diária, além de ensaios de biocompatibilidade deste novo nanobiomaterial.

Com relação aos dados obtidos por espectroscopia FT-Raman, informações importantes, principalmente sobre o componente orgânico da dentina, foram encontradas. A

partir dos dados obtidos por espectroscopia FT-Raman pode-se observar que todos os tratamentos com aplicação de biomateriais e ciclagem erosiva não causaram alterações significativas na área da banda do fosfato com deslocamento Raman em 961 cm^{-1} (Figuras 24-26). Com relação ao carbonato, foi observado um aumento estatisticamente significativo da área da banda em 1071 cm^{-1} nas amostras do grupo 3 após o procedimento de ciclagem erosiva (Figura 26). Tal incremento no componente carbonato pode ter ocorrido após a deposição da nHAp e reação da mesma à saliva artificial utilizada durante a ciclagem erosiva.

Logo após a aplicação dos biomateriais, foi observado que a área da banda do colágeno com deslocamento Raman em 2941 cm^{-1} foi maior no G2 e menor em G6 e G7 do que no controle (G1) (Figura 30). É possível que uma maior área de banda tenha sido encontrada devido à desmineralização da dentina pelo flúor fosfato acidulado em gel (G2), o que resultou na abertura dos túbulos dentinários e exposição das fibras colágenas. Nos grupos em que a área foi menor (G6 e 7) é possível que após a aplicação do flúor acidulado, a incorporação dos biomateriais (compósito de CNT/Grafeno, G6 e compósito CNT/Grafeno/nHAP, G7) tenha formado uma barreira adicional diminuindo a exposição das fibras colágenas e a área desta banda.

Nas comparações de um mesmo grupo, considerando a área da banda antes e depois da erosão, menores áreas foram encontradas após a erosão nas amostras de G1, G2 e G4 (Figura 30, letras minúsculas). A área menor neste caso pode ser devida a dois fatores: o primeiro seria o efeito protetor exercido pela própria saliva artificial em G1 e G2 e o efeito de camada adicional de biomaterial em G4, o que pode ser comprovado pelas micrografias obtidas após a erosão (Figura 34 e Figura 35). Estes resultados corroboram com estudos anteriores que mencionam a importância da matriz orgânica da dentina em processos de remineralização com flúor (GANSS et al., 2001; 2004; GAJJERAMAN et al., 2007).

Ganss et al. (2001) verificaram em seu estudo que a perda mineral após erosão foi reduzida em aproximadamente 10% após utilização de dentifrício fluoretado e em 55% após intensa fluoretação (dentifrício, fluoreto em solução e fluoreto em gel), a qual foi suficientemente efetiva para inibir completamente a progressão da erosão após um período inicial de desmineralização. Este resultado está provavelmente relacionado com o desenvolvimento de uma camada superficial desmineralizada rica em colágeno agindo como uma membrana de tamponamento, que protege as camadas mais profundas da dentina contra baixos valores de pH. Na presença de quantidades elevadas de fluoreto, a capacidade de

tamponamento do material orgânico parece ser suficiente para reduzir ou inibir a desmineralização (GANSS et al., 2004).

Gajjeraman et al. (2007) observaram em seu estudo que os constituintes orgânicos dos ossos e dentes, nomeadamente colágeno do tipo I e proteína da matriz dentinária 1 (PMD 1), são eficazes moduladores de cristal. Eles controlam a nucleação de polimorfos de fosfato de cálcio e a união hierarquicamente ordenada de material compósito cristalino. Os autores observaram que, na presença de colágeno do tipo I, a cristalinidade da HAP foi muito maior do que na presença da PMD 1 por si só. Isto poderia ser atribuído ao crescimento de HAP no interior do espaço restrito definido pelo colágeno tipo I (GAJJERAMAN et al., 2007). A matriz de colágeno fornece o enquadramento organizativo e restrição espacial para a deposição de cristal, enquanto que as macromoléculas matriciais não colágenas podem estar envolvidas no controle da nucleação e crescimento da fase mineral (GAJJERAMAN et al., 2007).

Diante dos resultados apresentados, torna-se evidente a importância da avaliação do consumo de bebidas ácidas e do uso associado ou não de nanobiomateriais como método de proteção da dentina frente à erosão ácida. As bebidas ácidas são utilizadas com grande frequência pelos pacientes e muitas vezes são ingeridas diariamente. Este consumo pode gerar efeitos como a erosão ácida de regiões expostas como a dentina radicular, desencadeando problemas como a hipersensibilidade dentinária, por exemplo. Portanto, a avaliação dos efeitos destes nanobiomateriais é de extrema importância para em um futuro próximo aplicá-los como uma possibilidade de tratamento na clínica.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O tratamento da dentina com nHAp resultou em aumento da área da banda referente ao componente carbonato devido à uma possível interação com a saliva artificial.
- ✓ O tratamento da dentina com a aplicação do flúor acidulado associado com compósito de CNT/Grafeno e compósito CNT/Grafeno/nHAp resultou em diminuição da área da banda referente ao colágeno o que pode ter ocorrido por formação de uma barreira adicional diminuindo a exposição das fibras colágenas e a área desta banda.
- ✓ Após a ciclagem erosiva ocorreu uma redução na intensidade do pico referente à banda G' indicando uma possível remoção dos NTC pelo processo erosivo.
- ✓ Através das micrografias obtidas por MEV verificou-se que os grupos que receberam os NTC apresentaram retenção de partículas de nHAp e enovelados de NTC após a ciclagem erosiva, indicando assim uma interação positiva com a dentina.

7. TRABALHOS FUTUROS

A técnica de recobrimento da dentina radicular com nanobiomateriais como camada protetora em situações de erosão dental mostrou-se promissora. Em estudos futuros pretende-se analisar parâmetros como o tempo ideal de deposição dos nanobiomateriais, qual a solução ideal para a dispersão dos mesmos. É importante também a avaliação da interação do colágeno com o compósito NTC/Grafeno, com o estudo da composição química e de quais cadeias participam desta ligação entre o componente orgânico da dentina e o biomaterial.

REFERÊNCIAS

AJAYAN, P. M.; ZHOU, O. Z. Applications of carbon nanotubes. **Topics Appl. Phys.**, v.80, p.391–425, 2001.

AKASAKA, T. et al. Modification of the dentin surface by using carbon nanotubes. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v.19, p.179–185, 2009.

ALEKSEJUNIENE, J.; HOLST, D.; BALCIUNIENE, I. Factors influencing the caries decline in lithuanian adolescents—trends in the period 1993–2001. **Eur. J. Oral Sci.**, v.112, p. 3–7, 2004.

ALMEIDA E SILVA J. S. et al. Erosão dental: uma doença dos tempos atuais. **Clín. Int. J. Braz. Dent.**, v.3, n.2, p.151-60, 2007.

ANTUNES, E. F. et al. Comparative study of first- and second-order Raman spectra of MWCNT at visible and infrared laser excitation. **Carbon**, v.44, p.2202-2211, 2006.

ATTIN, T.; ZIRKEL, C.; HELLWIG, E. Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions. **Caries Res.**, v.32, p.344–350, 1998.

BARBOSA, M. C. et al. The effect of ultrasonic irradiation on the crystallinity of nano-hydroxyapatite produced via the wet chemical method. **Mat. Sci. & Eng. C**, v.33, p.2620-2625, 2013.

BARRON, R. P. et al. Dental erosion in gastro esophageal reflux disease. **J. Can. Dent. Assoc.**, v.69, p.84-89, 2003.

BESINIS, A.; VAN NOORT, R.; MARTIN, N. Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles. **Dent. Mater.**, v.28, n.9, p.1012-1023, 2012.

BEUVELOT, J. et al. In vitro calcification of chemically functionalized carbon nanotubes. **Acta Biomater.** v.6, p. 4110–4117, 2010.

BOUILLAGUET, S. Biological risks of resin-based materials to the dentin-pulp complex. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v.15, n.1, p.47-60, 2004.

BRAGA, S. R. M. et al. Morphological and mineral analysis of dental enamel after erosive challenge in gastric juice and orange juice. **Microsc. Res. Tech.**, v.74, n.12, p.1083-1087, 2011.

BRANCO, C. A. et al. Dental erosion: diagnosis and treatment options. **Ver. Odontol. UNESP**, v.37, n.3, p.235-242, 2008.

CARVALHO, L. P. M. et al. Estadiamento clínico da disfunção temporomandibular: estudo de 30 casos. **Odontol. Clin-Cient.**, v.7, n.1, p.47-52, 2008.

CARVALHO FILHO, A. C. B. et al. Energy dispersive x-ray spectrometry study of the protective effects of fluoride varnish and gel on enamel erosion. **Microsc. Res. Tech.** v.74, p.839-844, 2011.

CHEONG, Y. et al. Nanostructural effect of acid-etching and fluoride application on human primary and permanent tooth enamels. **Mater. Sci. Eng. C**, v.32, p.1127-1132, 2012.

CHOUDHARY, V.; GUPTA, A. Polymer/carbon nanotube nanocomposites. In: YELLAMPALLI, S. **Carbon nanotubes - polymer nanocomposites**. Rijeka: InTech, 2011. p.65-90. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/carbon-nanotubes-polymer-nanocomposites/polymer-carbon-nanotube-nanocomposites>>. Acesso em: 01 jul. 2013.

CORRER, G. M. et al. Influence of diet and salivary characteristics on the prevalence of dental erosion among 12-year-old schoolchildren. **J. Dent. Child.**, v.76, p.181-187, 2009.

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.4.3, p.29-38, 2009.

FEATHERSTONE, J. D.; LUSSI, A. Understanding the chemistry of dental erosion. **Monogr. Oral. Sci.**, v.20, p.66-76, 2006.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of calcium deficient hidroxyapatite at near-physiological temperature. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.3, p.299-305, 1992.

GAJJERAMAN, S. et al. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hidroxyapatite. **The J. Biol. Chem.**, v.282, n.2, p.1193-1204, 2007.

GALLETI, S. R. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico**, v.65, p.33-35, 2003.

GANDARA B. K.; TRUELOVE E. L. Diagnosis and management of dental erosion. **J. Contemp. Dent. Pract.** v.15, p.16-23, 1999.

GANSS, C. et al. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel in vitro. **Caries Res.** v.35, p.325–330, 2001.

GANSS, C. et al. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. **Caries Res.**, v.38, p.561–566, 2004.

GARONE FILHO, W.; SILVA, V. A. **Lesões não cariosas: o novo desafio da odontologia.** São Paulo: Santos, 2008. 274 p.

GILCHRIST, F. et al. The use of micro-Raman spectroscopy to differentiate between sound and eroded primary enamel. **Int. J. Paed. Dent.**, v.17, p.274–280, 2007.

GJORGIEVSKA, E. S. et al. Remineralization of demineralized enamel by toothpastes: a scanning electron microscopy, energy dispersive x-ray analysis, and three-dimensional stereo-micrographic study. **Microsc. Microanal.**, v.19, p.587–595, 2013.

GRIPPO J. O.; SIMRING, M.; SCHREINER, S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.135, n.8, p.1109-1118, 2004.

HERBST, M. H.; MACEDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v.27, n.6, p.986-992, 2004.

HOOPER, S. et al. The protective effects of tooth paste against erosion by orange juice: Studies in situ and in vitro. **J. Dent.**, v.35, p.476–481, 2007.

HUANG, S.B.; GAO, S.S.; YU, H.Y. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. **Biomed. Mater.** v.4, n.3, p.034104, 2009.

JAEGGI, T.; LUSSI, A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. **Monogr. Oral Sci.**, v.20, p.44-65, 2006.

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

KATO, M. T. et al. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion in vitro. **J. Dent.**, v.37, p.233–236, 2009.

KINNEY, J. H. et al. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralisation. **J. Dent. Res.** v.74, p.1179–1184, 1995.

LEPRI, T. P. et al. Permeability of eroded enamel following application of different fluoride gels and CO₂ laser. **Lasers Med. Sci.**, v.28, p.235–240, 2013.

LI, L. et al. Repair of enamel by using hydroxyapatite nanoparticles as the building blocks. **J. Mater. Chem.**, v.18, p.4079–4084, 2008.

LIMA, L. R. et al. **Estudo dos efeitos da erosão ácida em restaurações radiculares por fluorescência de raios-x.** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2010.

LOBO, A. O. et al. Fast preparation of hydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned multiwalled carbon nanotube composites for bioactive application. **Langmuir**, v.26, n.23, 18308–18314, 2010.

LOBO, A. O. et al. Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites. **Mat. Sci. & Eng. C**, v.33, p.4305-4312, 2013a.

LOBO, A. O. et al. **Processo para produção de nanocompósitos de nanoapatitas e os ditos nanocompósitos.** BR10201300578. 11 mar. 2013b. Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

LUSSI, A.; JAEGGI, T. Erosion - diagnosis and risk factors. **Clin. Oral Invest.**, v.12, (Suppl.1), p.S5–S13, 2008.

MACHADO, N. A. G. et al. Dental wear caused by association between bruxism and gastroesophageal reflux disease: a rehabilitation report. **J. Appl. Oral Sci.**, v.15, p.327-333, 2007.

MAGALHÃES, A. C. et al. Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF₄) varnish on demineralization and remineralization of bovine enamel in vitro. **J. Dent.**, v.36, p.158–162, 2008.

MARSI, T. C. O. et al. Biomineralization of superhydrophilic vertically aligned carbon nanotubes. **Langmuir**, v.28, p.4413–4424, 2012.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. 1999. 126f Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia, Rio de Janeiro, 1999.

MESSIAS, D. C. F.; SERRA, M. C.; TURSSI, C. P. Estratégias para prevenção e controle da erosão dental. **RGO**, v.59, p.7-13, 2011.

MURAKAMI, C. et al. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. **Arch. Oral Biol.**, v.54, p.997–1001, 2009.

MURRAY, J. J. **O uso correto de fluoretos na saúde pública**. São Paulo: OMS; Ed. Santos, 1992.

NARVAI, P. C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v.5, n.2, p.381-392, 2000.

NEVES, M. F. et al. In vitro biomineralization of a novel hydroxyapatite/superhydrophilic multiwalled carbon nanotube nanocomposite using simulated body fluids. **Mater. Res.**, v.16, n. 3, p.650-654, 2013.

PARK K. J.; SCHNEIDER, H.; HAAK, R. Assessment of interfacial defects at composite restorations by swept source optical coherence tomography. **J. Biomed. Optics**, v.18, n.7, 076018, 2013.

PEREIRA, P. C. D. **Biocompatibilidade e principais aplicações de nanotubos de carbono** 2009. 37 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

RITTER, A.V. et al. Treating cervical dentin hypersensitivity with fluoride varnish: a randomized clinical study. **JADA**, v.137, p.1013-1020, 2006.

SAKOOLNAMARKA, R. et al. Raman spectroscopic study of noncarious cervical lesions. **Odontology**, v.93, n.1, p.35-40, 2005.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia raman e no infravermelho**. São Paulo: Ed.Unesp, 1995.

SCHILKE, R. et al. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. **Arch. Oral Biol.**, v.45, n.5, p. 355-361, 2000.

SMART, S. R. et al. The biocompatibility of carbon nanotubes. **Carbon**, v.44, p.1034-1047, 2006.

SOARES, L. E. S. **Aplicações da espectroscopia raman em dentística**. 2006. 183 f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

SOARES, L. E. S.; LIPORONI, P. C. S.; MARTIN, A. A. The effect of soft-start polymerization by second generation leds on the degree of conversion of resin composite. **Oper. Dent.** v.32, n.2, p.155-160, 2007.

SOARES, L. E. S. et al. Combined FT-Raman and SEM studies of the effects of Er:YAG laser irradiation on dentin. **Photomed. Laser Surg.**, v.25, n. 4, p. 239-244, 2007.

SOARES, L.E.S. et al. Effects of Er: YAG laser irradiation and manipulation treatments on dentin components, part 1: Fourier transform-Raman study. **J. Biomed. Opt.**, v.14, n.2, 2009.

SOARES, L. E. S. et al. Erosion effects on chemical composition and morphology of dental materials and root dentin. **Microsc. Res. Tech.** v.75, p.703–710, 2012.

SOARES, L. E. S.; CAMPOS, A. D. F.; MARTIN, A. A. Human and bovine dentin composition and its hybridization mechanism assessed by FT-Raman spectroscopy. **Journal of Spectroscopy**, v.2013, Article ID 210671, 7 p., 2013.

SUMIO, I. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v.354, p.56-58, 1991.

TSUDA, H. et al. Combined Raman and SEM study on CaF₂ formed on/in enamel by APF treatments. **Caries Res.**, v.27, p.445–454, 1993.

WEGEHAUPT, F. J. et al. Application of cerium chloride to improve the acid resistance of dentine. **Arch. Oral Biol.**, v.55, p.441-446, 2010.

WEGEHAUPT, F. J. et al. Anti-erosive potential of amine fluoride, cerium chloride and laser irradiation application on dentine. **Arch. Oral Biol.**, v.56, p.1541-1547, 2011.

WEST, N. X.; HUGHES, J. A.; ADDY, M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. **J. Oral Rehab.**, v.28, p.860-864, 2001.

XU, C.; WANG, Y. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. **Arch. Oral Biol.**, v.57, n.4, p.383-391, 2012.

XU, J. et al. An FT-Raman spectroscopic investigation of dentin and collagen surfaces modified by 2-hydroxyethylmethacrylate. **J. Dental Res.**, v.76, n.1, p.596-601, 1997.

YUAN, P. et al. Effects of dentifrice containing hydroxyapatite on dentinal tubule occlusion and aqueous hexavalent chromium cations sorption: a preliminary study. **PLoS ONE**. v.7, n.12, e45283, 2012.

ZHANG, F. et al. Surface modification and microstructure of single-walled carbon nanotubes for dental resin-based composites. **J. Biomed. Mater. Res. Part. B: Appl. Biomater.**, v.86B, p.90-97, 2008.

ZHENG, J. et al. Erosion behavior of human tooth enamel in citric acid solution. **Tribology. Int.**, v.42, p.1558-1564, 2009.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostra**. Porto Alegre: Edipuc, 2007. 60 p.

MAGALHÃES, A. C. et al. Insights into preventive measures for dental erosion. **J. Appl. Oral Sci.**, v.17, n.2, p.75-86, 2009.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
INSTITUTO DE PESQUISA & DESENVOLVIMENTO – IP&D

CERTIFICADO

O CEUA/UNIVAP, através do Protocolo n.º CEUA04/2012, autoriza o Dr. Luis Eduardo Silva Soares a realizar aproveitamento de material biológico dos projetos A46/CEP/2008 – AVALIAÇÃO POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X DOS EFEITOS DE VERNIZES FLUORETADOS NA EROSÃO ÁCIDA DENTAL e A005/CEP/2009 – ESTUDO ATRAVÉS DA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X DOS EFEITOS DO LASER DE CO2 NA PREVENÇÃO DA EROSÃO ÁCIDA, por estarem de acordo com a LEI 11.794/2008, que Regulamenta o inciso VII do 1º § do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais

Informamos que o pesquisador (a) responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório parcial após Doze Meses e um relatório final no prazo máximo de Dois Anos a contar da data de emissão deste certificado.

São José dos Campos, 10 de outubro de 2012.

Prof. Dr. José Carlos Cogo
Presidente da Comissão de Ética
no Uso de Animais – CEUA