



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Tese de doutorado

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO
DE NANOPARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO
CONTENDO FLÚOR E AVALIAÇÃO *IN VITRO*
DO POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO
DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA”**

Autora: Carolina Emmanuelle Camargos Lins
Orientadora: Profa. Marivalda de Magalhães Pereira
Co-Orientadora: Profa. Agda Aline Rocha de Oliveira
Março 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Carolina Emmanuelle Camargos Lins

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO
DE NANOPARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO
CONTENDO FLÚOR E AVALIAÇÃO *IN VITRO*
DO POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO
DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de Concentração: Ciência dos Materiais

Orientadora: Profa. Marivalda de Magalhães Pereira

Co-Orientadora: Profa. Agda Aline Rocha de Oliveira

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2015

Folha de Aprovação

AGRADECIMENTOS

- À Deus por mais essa benção e por sempre estar presente na minha vida;
- Aos meus pais Sandra e Newton por todo amor, apoio e dedicação;
- Ao meu marido Daniel por todo amor, carinho, apoio e compreensão;
- Aos meus irmãos Carliene, Carla e Carlos Eduardo e a minha tia Ana Lúcia pelo incentivo;
- À minha orientadora Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira pelos ensinamentos, oportunidade e amizade;
- À minha co-orientadora Profa. Dra. Agda Aline Oliveira pelos ensinamentos, apoio e amizade;
- À minha amiga Sandhra pela ajuda, incentivo e amizade;
- A todos os meus amigos da Engenharia Metalúrgica, especialmente, Alexandra, Alessandra, Ana Celeste, Breno, Bruna, Cheisy, Cynthia, Dickson, Elke, Fabiana, Joyce, Luísa, Tadeu e Talita;
- A meus amigos da Equipe de saúde bucal do Centro de Saúde Lajedo, Edson, Mirian, Paula e Ticiara;
- Aos professores da Engenharia Metalúrgica que me ajudaram nesse trabalho me cedendo equipamentos para meus experimentos, especialmente ao Prof. Dr. Rodrigo Oréfice, Prof. Dr. Herman Mansur e Prof. Dr. Dagoberto;
- Aos funcionários do DEMET: Andréia, Patrícia, Cida, Nelson e Hilda;
- Ao apoio financeiro do CNPq.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	X
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo geral	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Hipersensibilidade Dentinária – Definição, prevalência e incidência	7
3.2. Estrutura Dentinária	10
3.3. Estímulos que desencadeiam a Hipersensibilidade Dentinária	13
3.4. Fatores Etiológicos da Hipersensibilidade Dentinária	15
3.5. Tratamentos propostos para Hipersensibilidade Dentinária	17
3.6. Vidro Bioativo	23
3.7.1. Conceito e histórico vidro bioativo	23
3.7.2. Composição, características, aplicações e síntese	24
3.7.3. Vidro bioativo e hipersensibilidade dentinária	28
3.7.4. Nanopartículas de vidro bioativo	31
3.7. Sonoquímica	34
4- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR NO TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA	36
4.1. INTRODUÇÃO	36
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	36

4.2.1. Síntese das partículas de vidro bioativo	36
4.2.2. Síntese do gel com partículas de vidro bioativo	37
4.2.3. Preparação dos discos de dentina	37
4.2.4. Teste <i>in vitro</i> para avaliação da oclusão dos túbulos dentinários	38
4.2.5. Caracterização do gel	38
4.2.6. Caracterização dos discos de dentina	39
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.3.1. Partículas de vidro bioativo	39
4.3.2. Caracterização do Gel com partículas de VB – ensaio de resazurina	40
4.3.3. Caracterização dos discos de dentina	41
4.3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura	41
4.3.3.2. Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios-X	45
4.3.3.3. Difração de raios-X	46
4.3.3.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier	47
4.4. CONCLUSÕES	48
5- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO FLÚOR E AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> PARA TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA	49
5.1. INTRODUÇÃO	49
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.2.1. Síntese das micropartículas de vidro bioativo contendo flúor	49
5.2.2. Caracterização das Micropartículas de vidro bioativo contendo flúor	51
5.2.3. Síntese do gel contendo micropartículas de vidro bioativo com flúor	52
5.2.4. Preparação dos discos de dentina	52
5.2.5. Teste <i>in vitro</i> para avaliação da oclusão dos túbulos dentinários	52
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53

5.3.1. Caracterização das Micropartículas de vidro bioativo contendo	53
5.3.1.1. Microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia por dispersão de energia de raio X	53
5.3.1.2. Difração de Raio X	56
5.3.1.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier	59
5.3.1.4. Adsorção de N₂	61
5.3.1.5. Avaliação <i>in vitro</i> da oclusão dos túbulos dentinários	62
5.4. CONCLUSÕES	64
6. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO FLÚOR PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA	66
6.1. INTRODUÇÃO	66
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	70
6.2.1. Síntese das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor	70
6.2.2. Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor	72
6.2.3. Síntese do gel	74
6.2.4. Preparação dos discos de dentina	75
6.2.5. Teste <i>in vitro</i> para avaliação da oclusão dos túbulos dentinários	75
6.2.6. Caracterização do gel - Ensaio de citotoxicidade	76
6.2.7. Caracterização dos discos de dentina	78
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.3.1. Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor	78
6.3.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Dispersão de Energia	78
6.3.1.2. Análise do tamanho e morfologia das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor	80
6.3.1.3. Difração de Raio X	84

6.3.1.4. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	87
6.3.1.5. Adsorção de N ₂	88
6.3.1.6. Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X	89
6.3.2. Caracterização do gel – Ensaio de Citotoxicidade	96
6.3.3. Avaliação <i>in vitro</i> da oclusão dos túbulos dentinários	99
6.3.3.1. Avaliação <i>in vitro</i> da oclusão dos túbulos dentinários utilizando gel contendo nanopartículas de vidro bioativo com flúor	99
6.3.3.2. Avaliação <i>in vitro</i> da oclusão dos túbulos dentinários utilizando gel contendo micropartículas de vidro bioativo com flúor (Micro B)	106
6.3.4. Testes de comparação com produto existente no mercado	109
6.4. CONCLUSÕES	117
7. CONCLUSÕES FINAIS	119
8. CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO	120
9. RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS	121
10. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	122
11. ANEXOS	123
Anexo 1: Aprovação do comitê de ética em pesquisa - COEP	123
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática do movimento do fluido no interior dos túbulos dentinários (www.colgate.com.br).	8
Figura 2. Representação esquemática do prolongamento dos odontoblastos no interior dos túbulos dentinários (http://odontobloggers.blogspot.com.br).	11
Figura 3. Imagem de MEV discos de dentina apresentando os túbulos dentinários abertos (Trabalho COLAOB 2012)	12
Figura 4. Lesão cervical não cariada em caninos e pré-molares	16
Figura 5. Desenho esquemático da formação de hidroxiapatita	24
Figura 6. Imagem de MEV das partículas de vidro bioativo	40
Figura 7. Viabilidade celular. Demonstra um aumento de $142 \pm 5\%$, $156.7 \pm 11\%$ e $143 \pm 5\%$ na viabilidade dos fibroblastos gengivais quando em contato com 3%, 5% e 10% de gel de vidro bioativo respectivamente em comparação com o grupo controle ($p < 0.05$, $n=3$).	41
Figura 8. MEV discos de dentina antes do tratamento com gel com partículas de VB – túbulos abertos.	42
Figura 9. MEV discos de dentina após 1 dia de tratamento com gel com VB	43
Figura 10. MEV discos de dentina após 7 dias de tratamento com gel com VB	43
Figura 11. MEV discos de dentina após 14 dias de tratamento com gel com VB	44
Figura 12. MEV discos de dentina após 14 dias de tratamento com gel sem VB	44
Figura 13. Espectro de EDS realizado no interior dos túbulos dentinários após 14 dias de tratamento com gel com VB	46
Figura 14. Difrátograma de RX das amostras antes e depois (respectivamente) do tratamento por 14 dias com gel com VB.	47
Figura 15. Espectro de FTIR das amostras antes e após tratamento com gel com VB	48
Figura 16. Representação esquemática da síntese das micropartículas de vidro bioativo contendo flúor	50
Figura 17. (A) Imagem MEV, (B) Espectro geral de EDS,	54
Figura 18. Imagem macroscópica da amostra Micro A	55
Figura 19. (A) Imagem MEV e (B) Espectro de EDS das FVBMP 9% com ultrassom	56
Figura 20. Imagem macroscópica da amostra Micro B	56
Figura 21. Espectro de DRX das MPVBF (Micro A) com 0%F, 9%F, 27%F, 36% de flúor e do CaF_2	57
Figura 22. Espectro de DRX da amostra Micro A 9%F sem tratamento térmico e após tratamento térmico à 200°C, 400°C, 700°C e 900°C.	58
Figura 23. Espectro de DRX das amostras Micro A e Micro B tratadas a 700°C	59
Figura 24. Espectro de FTIR das MPVBF (Micro A) com 0%, 9%, 27% e 36% de flúor	60
Figura 25. Imagem MEV dos discos de dentina antes do tratamento com gel com MPVBF (Micro A)	63
Figura 26. Imagem MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com gel com MPVBF (Micro A)	64

Figura 27. Representação esquemática da síntese das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor	71
Figura 28. Imagem do gel contendo NPVBF	75
Figura 29. Imagem dos discos de dentina embutidos em resina acrílica	75
Figura 30. Imagem demonstrando a aplicação do gel contendo NPVBF nos discos de dentina	76
Figura 31. Microfotografia NPVBF 9,28%.....	79
Figura 32. Espectro de EDS das NPVBF 9,28%	79
Figura 33. Análise de DLS das NPVBF	80
Figura 34. Imagem de MFA das NPVBF e análise do tamanho das partículas.....	81
Figura 35. Imagem tridimensional das NPVBF obtidas por MFA	83
Figura 36. Imagem topográfica das NPVBF obtidas por MFA	83
Figura 37. Espectros de DRX das MPVBF (Micro B) e NPVBF com 9% de flúor.....	86
Figura 38. Espectro de FTIR das NPVBF e FMPVB 9% (Micro B) de flúor.....	87
Figura 39. Isotermas de adsorção/dessorção de N ₂ e análise BJH das NPVBF	88
Figura 40. Espectro XPS completo das amostras NPVBF 9%, Micro A 9%F e Micro B 9%F	90
Figura 41. Espectro XPS das amostras NPVBF 9%, Micro A 9%F e Micro B 9%F associados ao íon flúor	92
Figura 42. Espectro XPS das amostras NPVBF 9%, Micro A 9%F e Micro B 9%F associados ao íon cálcio	95
Figura 43. Gráfico do ensaio MTT após 72 horas de contato das células SAOS com as amostras (NPVBF 0,2%) e (NPVBF 1%).	97
Figura 44. Gráfico do ensaio MTT após 72 horas de contato das células SAOS com as amostras (NPVBF 0,2%) e (MPVBF 0,2%).	98
Figura 45. Imagem de MEV dos discos de dentina após ataque ácido.....	99
Figura 46. Imagem de MEV dos discos de dentina após 1 dia de tratamento com gel com NPVBF 9%F.	100
Figura 47. Imagem de MEV dos discos de dentina após 3 dias de tratamento com gel com NPVBF 9%F.	100
Figura 48. Imagem de MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com gel com NPVBF 9%F.	101
Figura 49. Imagem de MEV dos discos de dentina após 14 dias de tratamento com gel com NPVBF 9%F.	101
Figura 50. Análise EDS do disco de dentina após 14 dias de tratamento com gel NPVBF	104
Figura 51. Imagem MEV dos discos de dentina após 14 dias tratamento com gel sem NPVBF	105
Figura 52. Imagem de MEV dos discos de dentina após 1 dia de tratamento com gel com MPVBF 9%F (Micro B).	106
Figura 53. Imagem de MEV dos discos de dentina após 3 dias de tratamento com gel com MPVBF 9%F (Micro B).	107
Figura 54. Imagem de MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com gel com MPVBF 9%F (Micro B).	107
Figura 55. Imagem de MEV dos discos de dentina após 14 dias de tratamento com gel com MPVBF 9%F (Micro B).	108

Figura 56. Análise EDS do disco de dentina após 14 dias de tratamento com gel MPVBF (Micro B)	109
Figura 57. Imagem de MEV dos discos de dentina após 1 dia de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®	110
Figura 58. Imagem de MEV dos discos de dentina após 3 dias de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®	110
Figura 59. Imagem de MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®	111
Figura 60. Imagem de MEV dos discos de dentina após 14 dias de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®	111
Figura 61. Análise EDS do disco de dentina após 14 dias de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®	112
Figura 62. Imagem de MEV dos discos de dentina após 1 dia de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®	113
Figura 63. Imagem de MEV dos discos de dentina após 3 dias de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®	113
Figura 64. Imagem de MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®	114
Figura 65. Imagem de MEV dos discos de dentina após 14 dias de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®	114
Figura 66. Análise EDS do disco de dentina após 14 dias de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®	116
Figura 67. Imagem de MEV dos discos de dentina após tratamento com as NPVBF, MPVBF (Micro B), pasta Sensodyne Repair & Protect®, e pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®, nos intervalos de tempo 1, 3, 7 e 14 dias.	117

Lista de Tabelas

Tabela 1. Variação na composição nominal das MPVB contendo flúor	50
Tabela 2. Valores das áreas de superfície e volumes de poro das amostras Micro A e Micro B	62
Tabela 3. Composição nominal das NPVB contendo flúor.....	71

Lista de Notações

- (BET) - Brunauer-Emmett-Teller
(CR) - Conectividade de rede
(DLS) - Espalhamento Dinâmico de Luz
(DRX) - Difração de Raios X
(EDS) - Espectroscopia de Energia Dispersiva
(FAP) – Fluorapatita
(FC) – Fosfato de cálcio
(FTIR) - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
(HA) - Hidroxiapatita
(HAC) - Hidroxiapatita Carbonatada
(HD) - Hipersensibilidade Dentinária
(MEV) - Microscopia Eletrônica de Varredura
(MFA) - Microscopia de Força Atômica
(mg) - Miligra(s)
(mL) - Mililitro
(Mm) - Milimolar
(MPVBF) – Micropartículas de vidro bioativo contendo flúor
(MW) - Massa molar
(nm) - Nanômetros
(nM) - Nanomolar
(NPVB) - Nanopartículas de vidro bioativo
(NPVBF) - Nanopartículas do vidro bioativo contendo flúor
(TEOS) - tetraetil orthosilicato
(TEP) - Trietil fosfato
(US) - Ultrassom
(VB) - Vidro bioativo
(XPS) - Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X
($\mu\text{g}/\text{mL}$) - Micrograma(s) por mililitro
(μL) - Microlitro(s)
(μm) - Micrômetro(s)
(μM) - Micromolar

RESUMO

A hipersensibilidade dentinária é caracterizada por uma dor localizada, aguda, não espontânea e que ocorre em resposta a algum estímulo. Esta dor é causada pela perda da estrutura do dente, o que resulta na exposição dos túbulos dentinários para o ambiente oral. Vários métodos para o tratamento da hipersensibilidade dentinária foram pesquisados, no entanto, nenhum deles é completamente eficaz. Nas últimas décadas o vidro bioativo tem sido bastante utilizado em estudos sobre os efeitos específicos na remineralização, devido às suas excelentes propriedades regenerativas em tecidos mineralizados. Sabe-se que o efeito do vidro bioativo pode ser reforçado quando se apresenta em nanoescala. A incorporação do flúor pode resultar na formação da fluorapatita (FAP), a qual é quimicamente mais estável do que a hidroxiapatita (HA) ou hidroxiapatita carbonatada (HAC) e, portanto, é de interesse para aplicações odontológicas. O objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar as nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor (NPVBF) e avaliar o seu potencial de remineralização *in vitro*, pela oclusão dos túbulos dentinários de discos de dentina. O efeito do tamanho de partícula e da composição dos vidros bioativos foi analisado e comparado, no intuito de aumentar a eficácia do tratamento da hipersensibilidade dentinária. Como a síntese das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor pela rota sol gel é uma pesquisa pioneira, etapas prévias foram necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. Sendo assim, este estudo avaliou inicialmente as partículas de vidro bioativo sem flúor, posteriormente as micropartículas de vidro bioativo contendo diferentes teores de flúor, sintetizadas com e sem ultrassom, para finalmente sintetizar e avaliar as nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor. As NPVBF foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), Microscopia de Força Atômica (AFM), Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Brunauer-Emmett-Teller (BET) e Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X (XPS). Para os estudos *in-vitro* foram utilizados dentes obtidos a partir do banco de dentes da FO-UFMG. As amostras de discos de dentina foram desmineralizadas com ácido fosfórico e tratadas durante 1, 3, 7 e 14 dias com gel contendo NPVBF. Posteriormente as amostras tratadas foram analisadas por MEV. O gel foi caracterizado pelo teste de MTT para avaliar sua biocompatibilidade. As NPVBF sintetizadas apresentaram forma esférica em escala nanométrica, ocorrendo aglomeração ou sinterização parcial do sistema particulado

após tratamento térmico. O flúor estava presente no sistema e, a partir dos resultados das técnicas de análise utilizadas, sugere-se que ocorreu a formação de cristais de fluorapatita incorporados no interior da matriz do vidro bioativo. O gel contendo NPVBF testado não apresentou citotoxicidade e foi eficaz em obliterar os túbulos dentinários *in vitro*, atingindo este resultado após um dia de aplicação, apresentando resultados superiores ao das pastas já comercializadas. Sendo assim, é possível concluir que a NPVBF sintetizadas neste estudo, é um material com grande potencial para ser utilizado para melhorar o tratamento da hipersensibilidade dentinária.

ABSTRACT

Dentin hypersensitivity is characterized by sharp localized pain, non spontaneous, and occurring in response to some stimulus. This pain is caused by loss of the tooth structure, resulting in exposure of dentinal tubules to the oral environment. Several methods for treating dentin hypersensitivity have been researched; however none of them was completely effective. In the last decades bioactive glass has been used on studies about the specific effects on remineralization of dentin, due to their excellent regenerative properties in mineralized tissues. It is known that the effect of bioactive glass can be enhanced in the nanoscale. The incorporation of Fluor may result in formation of fluorapatite (FAP), which is chemically more stable than hydroxyapatite or carbonated hydroxyapatite, and therefore is of interest for dental applications. The aim of this study was to synthesize and characterize a new system of Fluor containing bioactive glass nanoparticles (BGNPF), and evaluate the potential of remineralization *in vitro* by occlusion of dentinal tubules of dentin discs. The effect of size and composition of bioactive glasses was analyzed and compared, in order to increase the effectiveness of the treatment of dentin hypersensitivity. As the synthesis of BGNPF by the sol gel route is a pioneer research, previous steps were necessary for the development of this work. Thus, this study initially evaluated bioactive glass particles not containing Fluor, than microparticles of bioactive glass containing different Fluor contents, with and without the use of ultrasound, to finally synthesize and evaluate the Fluor containing bioactive glass nanoparticles. BGNPF were synthesized by sol-gel route and characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy dispersive spectroscopy (EDS), Atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD), Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), Energy dispersive spectroscopy (EDS) and Dynamic Light Scattering (DLS), Brunauer-Emmett-Teller (BET) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). For the *in-vitro* study teeth obtained from the bank of teeth from the Dental School of the Federal University of Minas Gerais were used. The dentin samples were demineralized with phosphoric acid 37% and treated for 1, 3, 7 and 14 days with gel containing FBGNP. The gel was characterized by MTT to evaluate its biocompatibility. SEM micrographs showed that the particles are quite uniform spherical nanostructures, occurring agglomeration or partial sinterization of the particulate system after heat treatment. EDS analysis indicated the presence of Fluor in the system, and the results of the various analysis techniques used suggest the formation of fluorapatite crystals embedded within the matrix of the bioactive glass. The

gel containing NPVBF presented no cytotoxicity and was effective in obliterating the dentinal tubules *in vitro*, reaching this result after 1 day of application, presenting better results than the pastes already in the market. Therefore, it is possible to conclude that NPVBF it is a potential material to be used for treatment of dentin hypersensitivity.

1. INTRODUÇÃO

A melhora na saúde bucal da população tem trazido benefícios, fazendo com que os dentes sejam mantidos por mais tempo na cavidade oral. Porém, ao mesmo tempo, tem aumentado a incidência de outros problemas como a hipersensibilidade dentinária (HD). Com o declínio da doença cárie e da doença periodontal, o tratamento da hipersensibilidade dentinária vem ganhando prioridade (Rees e Addy 2002; Ritter *et al.*, 2006; Shiau H.J., 2012).

Para alguns pacientes, a hipersensibilidade dentinária pode representar somente uma inconveniência menor, mas para muitos o grau de desconforto e angústia emocional pode ser muito prejudicial (Santos *et al.*, 2003). Com o aumento da perspectiva de vida, os problemas com recessão gengival e erosão tendem a aumentar. Além disso, o desconforto causado pela sensibilidade da dentina pode levar a modificações de comportamento, tais como mudança na dieta e inadequado controle de placa, o que poderia aumentar ainda mais a HD. Isso pode acarretar também cáries, inflamação gengival e destruição periodontal (Trushkowsky *et al.*, 2011; Shiau, 2012; Tonetto *et al.*, 2012).

A HD surge quando se aplica um estímulo que normalmente não provocaria dor. Esta pode ser causada por estímulos térmicos (quente ou frio), evaporativos (jato de ar), táteis (com sonda exploradora na superfície dentária ou escovação), osmóticos (sal, açúcar), químicos (biofilme dental, frutas ácidas e alimentos condimentados) e elétricos. Todos esses estímulos envolvem o movimento de fluido dentinário com exceção do estímulo elétrico (Pashely, 1992; Bramante, Vale, 1996, Camps, Pashley, 2003; Shiau, 2012; Tonetto *et al.*, 2012).

Segundo Perez (2003), a hiperestesia dentinária representa um dos problemas mais comuns na clínica diária do cirurgião-dentista e, apesar de estudada intensamente, infelizmente é, muitas vezes, de tratamento difícil e frustrante. A hipersensibilidade dentinária pode ser tratada com dentifrícios específicos, flúor, adesivos dentários, uso de laser, restaurações, cirurgias muco-gengivais e tratamento endodôntico. Com exceção do tratamento endodôntico, todos os outros tratamentos buscam obliterar os túbulos dentinários, diminuindo ou cessando a hipersensibilidade. Entretanto, o grande desafio da odontologia moderna é encontrar uma substância que seja eficaz em um

curto espaço de tempo, que não cause recidiva de hipersensibilidade e que elimine efetivamente a sensação dolorosa (Aranha *et al.*, 2004).

De acordo com o estudo clássico de Grossman, em 1935, o material ideal para tratamento de hipersensibilidade dentinária deve ser biocompatível, de fácil aplicação, ter efeito permanente e ação rápida, não ser irritante pulpar, além de não alterar a cor da estrutura dental (Aranha *et al.*, 2004).

Por meio de uma análise microscópica, é possível observar que os túbulos dentinários se apresentam mais numerosos e amplos na dentina hipersensível do que na dentina insensível (Absi *et al.*, 1995). Essas observações são consistentes com a hipótese da dor dentinária ser mediada por um mecanismo hidrodinâmico (Brännström, *et al.* 1963). De acordo com esse mecanismo proposto, um estímulo causador de dor aplicado à dentina aumenta o fluxo do fluido tubular dentinário que, por sua vez, ativa mecanicamente os nervos situados nas extremidades internas dos túbulos ou nas camadas externas da polpa, desencadeando, assim, um estímulo doloroso. Para que isso ocorra, é necessário que os túbulos dentinários estejam expostos ao meio bucal a fim de receber tais estímulos capazes de desencadear a resposta dolorosa (Orchardson *et al.*, 2006; Tonetto *et al.*, 2012).

Diversas terapêuticas têm sido propostas para o tratamento da hipersensibilidade dentinária, sendo seus modos de ação baseados no bloqueio da ativação neural e da transmissão do estímulo doloroso por meio do uso de agentes dessensibilizantes, e/ou pelo impedimento da movimentação de fluido no interior dos túbulos dentinários por meio de sua oclusão (Orchardson *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2010; Shiau, 2012; Tonetto *et al.*, 2012).

A hipersensibilidade dentinária é considerada um desafio para os profissionais da área odontológica por seu difícil tratamento, podendo afetar o componente emocional e a qualidade de vida do paciente. Apesar da vasta literatura sobre o assunto, não se conhece ainda uma forma de resolução definitiva do problema, sendo assim, há a necessidade de novos materiais e mais estudos sobre o assunto para avaliar melhor o desempenho dos diversos agentes dessensibilizantes.

Uma das novas abordagens para o tratamento mais efetivo da hipersensibilidade dentinária tem utilizado as propriedades dos vidros bioativos (VB), que produzem uma resposta biológica específica em suas superfícies quando em contato com os tecidos vivos. Por ser a constituição dental muito similar à constituição óssea, foi proposto o uso de VB com a capacidade de se depositarem no interior dos túbulos dentinários, para que, na presença dos fluidos bucais, inicie o processo de formação de hidroxiapatita (HA), resultando em sua oclusão por meio de uma ligação química com o material (Kokubo *et al.*, 2008, Chu *et al.*, 2010).

Entretanto, um inconveniente para a utilização dos vidros bioativos na forma particulada incorporado a produtos de higiene oral – principalmente daqueles em que o uso envolve escovação ou fricção – é o poder cortante das partículas vítreas devido às suas superfícies extremamente irregulares, pontiagudas e afiadas. Dessa forma, as partículas de vidro moído podem provocar microcortes na gengiva, causando a sua irritação e, possivelmente, o aumento de sensação dolorosa nos pacientes (Siqueira *et al.*, 2011). Este efeito colateral pode ser minimizado, ou até mesmo eliminado, se forem utilizadas partículas esféricas.

Desde que foi desenvolvido por Hench (1988) como um material promissor para o reparo ósseo com elevadas bioatividade e biocompatibilidade, o vidro bioativo é objeto de estudo para diversos grupos de pesquisa. Várias investigações foram conduzidas com a finalidade de se obter vidros bioativos pelo método sol-gel (Oliveira *et al.*, 2012, 2013, 2014). A nanotecnologia fornece uma nova estratégia para o desenvolvimento de vidros bioativos, potencializando seus efeitos, uma vez que materiais em nanoescala exibem aumento em sua biocompatibilidade, bioatividade, dispersão e difusão, o que facilitaria sua ação e acesso em regiões da boca pouco acessíveis durante a escovação. Um creme dental contendo vidro bioativo com uma grande fração de partículas pequenas o suficiente para penetrar nos túbulos dentinários, e em seguida ocluir os túbulos pela formação de HCA, atuaria como um importante veículo para reduzir a sensibilidade dentinária.

Assim, este estudo é focado na obtenção de nanopartículas de vidro bioativo (NPVB) de formato esférico com o objetivo de reduzir o efeito cortante das partículas, e também de produzir um material bioativo com capacidade de dispersão e a manutenção da estabilidade das partículas. Estudos relataram a capacidade das

NPVB para dispersão em diferentes condições usando agentes tensioativos para melhorar a dispersão das nanopartículas e / ou controlar a sua forma (Oliveira *et al.*, 2013, 2014).

O flúor é bastante conhecido por ser benéfico para a remineralização e fortalecimento do tecido dentário (Shiau, 2012; Tonetto *et al.*, 2012). Quando flúor está presente no VB, a fluorapatita (FAP) é formada. A formação da FAP, em vez de HCA é preferível, por ser quimicamente mais estável em pH mais baixo e, portanto, seria menos prontamente dissolvida quando exposta a condições ácidas da boca (por exemplo, durante o consumo de suco de frutas e bebidas gaseificadas) o que pode proporcionar uma opção mais sustentável para o tratamento da hipersensibilidade dentinária (Lynch *et al.*, 2011; Brauer *et al.*, 2010, 2011, 2012).

Outros estudos já avaliaram e relataram o benefício da incorporação do flúor ao vidro bioativo, contudo foram utilizados vidros bioativos sintetizados pela técnica de fusão (Lynch *et al.*, 2011; Brauer *et al.*, 2010, 2011, 2012).

Sendo assim, este trabalho visa sintetizar e caracterizar micro e nanopartículas esféricas de vidro bioativo com e sem flúor em sua composição, incorporadas em géis, a fim de se avaliar o efeito do tamanho e da composição do vidro para aumentar e otimizar a eficácia do tratamento da hipersensibilidade dentinária. A fim de se investigar se a proposta de uso do gel com NPVB contendo flúor é válida, será testada a eficácia do mesmo frente a outros produtos para tratamentos dessensibilizantes já comercializados no mercado.

Como a síntese e caracterização das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor pela rota sol-gel é uma pesquisa pioneira, etapas prévias foram necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. Sendo assim, este estudo avaliou inicialmente a produção de partículas de vidro bioativo sem flúor; posteriormente foram produzidas micropartículas de vidro bioativo contendo flúor, sintetizadas por duas rotas distintas, com e sem ultrassom, para finalmente sintetizar as nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor. Para que os resultados deste estudo sejam apresentados de forma mais clara e didática, o desenvolvimento experimental deste trabalho foi dividido em três capítulos:

No capítulo 4 é apresentada a síntese via rota sol-gel de partículas de vidro bioativo, sua caracterização, e uma avaliação preliminar do seu potencial para aplicação no tratamento da hipersensibilidade dentinária;

O capítulo 5 apresenta um estudo da síntese e caracterização de micropartículas de vidro bioativo contendo diferentes teores de flúor para potencial aplicação no tratamento da hipersensibilidade dentinária;

A partir dos resultados dos estudos anteriores, o capítulo 6 apresenta então o desenvolvimento da síntese e caracterização de um sistema de nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor e avaliação *in vitro* do seu potencial para aplicação no tratamento da hipersensibilidade dentinária.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produção de esferas de vidro bioativo com e sem flúor em sua composição, em escala micro e nanométrica para serem incorporadas em géis desenvolvidos para obliteração dos túbulos dentinários com potencial utilização no tratamento da hipersensibilidade dentinária.

2.2. Objetivos específicos

- Síntese e caracterização de partículas esféricas de vidro bioativo em micro e nano escala;
- Incorporação de flúor em teores variados nas esferas de vidro produzidas e caracterização dos materiais obtidos;
- Formulação de géis contendo as partículas de vidro bioativo produzidas;
- Avaliação da citotoxicidade do gel desenvolvido;
- Realização de testes *in vitro* para avaliar a ação do gel nos discos de dentina;
- Realização dos testes *in vitro* com pasta já comercializada no mercado para tratamento da hipersensibilidade, para controle e comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hipersensibilidade Dentinária – Definição, prevalência e incidência

A hipersensibilidade (hiperestesia) dentinária (HD) é definida como uma sensibilidade exagerada da dentina vital, caracterizada por dor de curta duração, aguda e súbita, persistindo somente durante a aplicação do estímulo. É caracterizada como uma resposta dolorosa exagerada a um estímulo que normalmente não causaria dor em um dente sadio e que não pode ser atribuída a nenhuma outra forma de defeito ou patologia dental. Surge em resposta a estímulos térmicos (quente ou frio), mecânicos ou táteis (escovação), evaporativos (jatos de ar), osmóticos ou químicos (frutas ácidas, alimentos condimentados, açúcar e sal) sobre os túbulos dentinários abertos em regiões com exposição de dentina ao meio bucal. A exposição dos túbulos dentinários pode ocorrer pela perda de esmalte e/ou cemento e é responsável por uma redução do limiar de dor do paciente, motivo suficiente para que ele procure auxílio profissional. (Corona *et al.*, 2003). Isso pode ocorrer em decorrência de recessões gengivais, erosões, atrições ou abrasões radiculares, bem como de tratamentos periodontais não cirúrgicos e cirúrgicos (Brännström *et al.*, 1967; Arrais *et al.*, 2003; Leme *et al.*, 2004; Waraaswapati *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2005; Shiau, 2012; Tonetto *et al.*, 2012).

Sabe-se que a HD está relacionada com o movimento do fluido presente dentro dos túbulos dentinários (Figura 1), que é diretamente dependente do número e do diâmetro de túbulos expostos ao ambiente bucal. A HD é uma condição multifatorial, em que a dentina encontra-se exposta e permeável, porém a resposta do hospedeiro também deve ser considerada. Contudo, nem toda dentina exposta é sensível, pois é necessário que esta seja permeável, permitindo que o estímulo hidrodinâmico induza a um suficiente movimento do fluido para ativar receptores pulpares (Camps, Pashley, 2003; Shiau, 2012; Tonetto *et al.*, 2012). Dois processos precisam ocorrer para que a HD se estabeleça. A dentina tem que estar exposta (localização da lesão), e o sistema de túbulos dentinários precisa estar aberto (início da lesão). Esses dois fatores associados à presença dos fatores etiológicos são determinantes para o surgimento da HD (Bánóczy, 2002; Bramante, Vale, 1996). A exposição dentinária ocorre com o desgaste de esmalte e/ou cemento e dentre os fatores que levam à exposição, temos: cáries, erosão, abrasão, hipoplasias, trauma oclusal, dietas, pós-tratamento

ortodôntico, regurgitação gástrica e fatores hereditários (Bramante, Vale, 1996). A maioria dos dentes hipersensíveis apresenta recessão gengival resultante de doença periodontal, tratamento periodontal, ou hábitos de escovação inadequados (Wara-aswapati *et al.*, 2005; Shiau, 2012; Tonetto *et al.*, 2012).



Figura 1. Representação esquemática do movimento do fluido no interior dos túbulos dentinários (www.colgate.com.br).

A prevalência da HD é muito variável, podendo ser 8% a 57%, dependendo da população estudada, metodologia empregada e recursos de diagnóstico utilizados para a avaliação (Ritter *et al.*, 2006; Wara-aswapati *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2005).

Estudos apresentam uma grande variação na prevalência da hipersensibilidade dentinária, provavelmente devido a diferentes metodologias empregadas e por se tratar de algo subjetivo, a dor (Bánóczy, 2002).

A exposição da dentina cervical é mais comum vestibularmente e em caninos e pré-molares, sendo que a prevalência aumenta com a idade e em pacientes com boa higiene bucal. Entretanto, é preciso entender que dados relativos à prevalência podem variar de um país para outro e de região para região, devido à variação de hábitos sociais e alimentares. Aproximadamente quarenta milhões de adultos na América do Norte já apresentaram a HD por algum tempo. A cada seis pacientes que chegam à clínica para tratamento dental, um deles apresenta algum grau de HD, em pelo menos um dente (Tonetto *et al.*, 2012).

Segundo Almeida (2006), a hipersensibilidade dentinária afeta 35% da população mundial. De acordo com Hotta (2006), essa hipersensibilidade afeta uma a cada seis pessoas, com incidência maior em indivíduos na faixa etária de 30 anos e igualmente dividido entre homens e mulheres. Apesar de o idoso apresentar maior quantidade de dentina exposta, é o adulto jovem (25-35 anos) que relata maior intensidade de dor. A explicação dada para essa situação é que o jovem está iniciando a exposição dentinária no meio bucal, e não houve tempo para que o vedamento dos túbulos dentinários tenha ocorrido espontaneamente, impedindo a hipersensibilidade (Sobral, 2003). A incidência da hipersensibilidade dentinária é levemente maior em mulheres do que em homens, diferença esta não estatisticamente representativa (Rico, 1992).

A junção cimento-esmalte pode ocorrer de três formas distintas, na qual, o cimento pode estar recobrindo o esmalte (60-65%), o cimento e o esmalte podem estar topo a topo (30%) ou pode haver uma falha na união desses dois tecidos (5-10%), expondo dentina. Quando a união esmalte-cimento não ocorrer, parte da dentina ficará exposta na região onde não houve fragmentação da bainha epitelial de Hertwig. Essa condição fisiológica também pode ser um fator etiológico da hipersensibilidade dentinária (Bramante e Vale, 1996). A dentina exposta pode se apresentar coberta por uma *smear layer* e os túbulos podem estar obliterados por depósitos de fosfato de cálcio derivados da saliva. A remoção dessa camada superficial por agentes químicos ou mecânicos, pode promover a abertura dos túbulos dentinários, predispondo à HD (Bánóczy, 2002).

Em pacientes com doença periodontal, a hipersensibilidade dentinária tem uma prevalência entre 72,5-98,0%. A sensação dolorosa tende a aumentar após a realização de raspagem e alisamento radicular, pois esse procedimento pode remover o cimento que protege a dentina, expondo assim os prolongamentos dos canalículos dentinários (Drisko, 2002).

Uma ampla gama de prevalência da HD é relatada na literatura. Por exemplo, estima-se que a prevalência de 3% a 73% da população adulta dos Europa Ocidental e nos Estados Unidos. Novamente, a heterogeneidade da prevalência, provavelmente, pode estar relacionada com a avaliação métodos, que vão desde questionários a detecção clínica, e possivelmente relacionados com o local de estudo. A partir de estudos disponíveis, conclui-se que a incidência de HD nas populações varia entre 10% a 30%.

Alguns estudos indicam que os dentes molares são menos susceptíveis de ser afetados por HD. O papel da idade na distribuição ou incidência de HD não é clara. Por um lado, a gravidade da condição com o aumento da idade foi atribuído à prevalência aumentada de doença periodontal. Ao mesmo tempo, outros estudos indicam um pico na ocorrência de HD entre a terceira e quarta década (Shiau, 2012).

Embora a presença de dentes sensíveis afete mais de 40% dos adultos, poucos deles procuram tratamento profissional. Pouca atenção se dá a esse problema tanto nas pesquisas científicas como nas práticas de tratamento (Bánóczy, 2002). Nos últimos 20 anos houve mudanças nas atitudes dos profissionais com relação à HD. Por se tornar cada vez mais prevalente, os profissionais da área odontológica não devem pensar apenas no tratamento da HD, mas também no controle dos fatores etiológicos.

3.2. Estrutura Dentinária

A dentina apresenta túbulos em toda sua espessura (Figura 2), os quais são preenchidos pelos prolongamentos de células especializadas, os odontoblastos (Bhaskar, 1989). Existe controvérsia sobre a extensão dos prolongamentos dos odontoblastos, contudo o estudo de Marshall (1997) verificou que eles chegavam a alcançar a junção esmalte-dentina. O número de túbulos dentinários em humanos aumenta consideravelmente da parte média até próximo à polpa, o que pode ser explicado pela convergência dos mesmos à medida que se aproximam da cavidade pulpar (Marshall *et al.*, 1997, Schilke *et al.*, 2000).

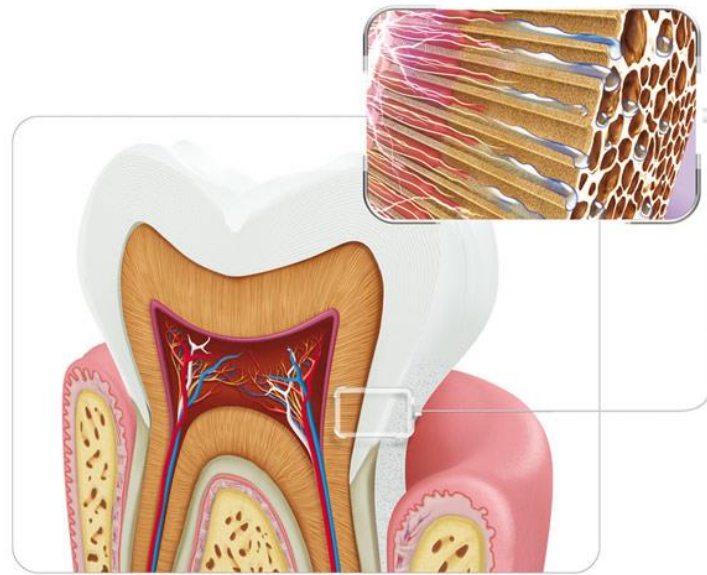


Figura 2. Representação esquemática do prolongamento dos odontoblastos no interior dos túbulos dentinários (<http://odontobloggers.blogspot.com.br>).

Macroscopicamente, a aparência da dentina não difere da dentina insensível, embora, à luz da microscopia eletrônica de varredura, os orifícios dos túbulos dentinários em áreas hipersensíveis mostrem-se abertos e, naqueles situados em áreas não sensíveis, as entradas dos túbulos mostrem-se obliteradas por cristais (Vale; Bramante, 1997).

Histologicamente, a dentina hipersensível apresenta túbulos dentinários alargados e em maior número por área, se comparada à dentina ausente de sensibilidade (Sobral, 2003).

Existem variações no número de túbulos entre diferentes dentes e sítios. A densidade e orientação dos túbulos variam dependendo da região em que estão localizados. Menor densidade dos túbulos é encontrada na porção radicular quando comparada a porção coronária (Marshall *et al.*, 1997; Dourda *et al.*, 1994). Estudos têm abordado questões relativas ao tamanho dos túbulos, espessura da dentina peritubular e quantidade de dentina intertubular (Figura 3). Na maior parte do seu curso, o lúmen dos túbulos dentinários é delineado por uma dentina peritubular altamente mineralizada denominada de dentina intratubular (Ten Cate, 1972), contendo em sua maior parte cristais de apatita com pouca matriz orgânica. Os túbulos são separados por dentina intertubular composta por matriz de colágeno tipo I e hidroxiapatita, a qual

varia com a localização (Marshall *et al.*, 1997). Dados mostram que a porcentagem de área e diâmetro tubular em humanos varia de aproximadamente 22% e 2,5 μ m próximo à polpa e 1% e 0,8 μ m na junção esmalte-dentina respectivamente. A área de dentina intertubular pode variar de 12% na pré-dentina a 96% próximo a junção esmalte dentina, e a dentina peritubular se apresenta de 60% a 3% na junção esmalte dentina (Pashley 1992). Devido ao desenvolvimento de dentina peritubular, o túbulo reduz seu diâmetro drasticamente a aproximadamente 0,5mm de distância da polpa humana (Garberoglio, Brännström 1976).

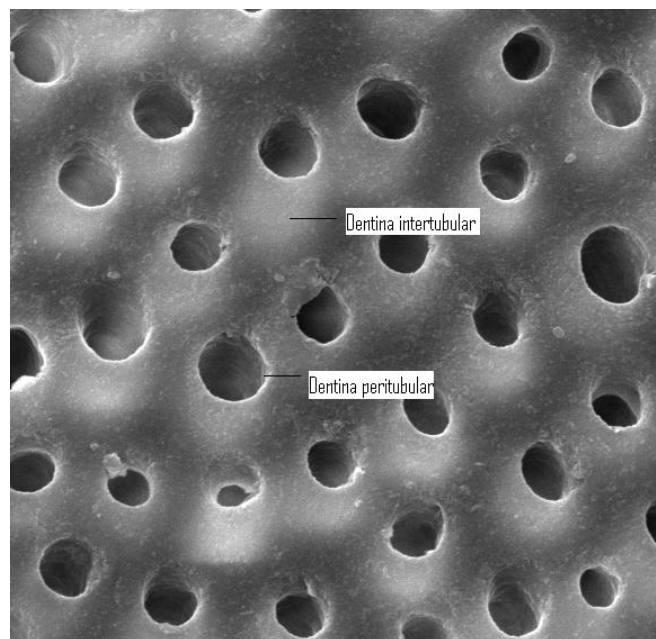


Figura 3. Imagem de MEV discos de dentina apresentando os túbulos dentinários abertos (Trabalho COLAOB 2012)

Schilke (2000) estudaram o número e o diâmetro dos túbulos dentinários em humanos, na camada de dentina profunda e encontraram 21.343 \pm 7.2túbulos/mm² com um diâmetro médio de 2,90 \pm 0,22 μ m e na dentina na porção média cerca de 18.781 \pm 5.8 túbulos/mm² com diâmetro médio de 2,65 \pm 0,19 μ m. Conforme estudos anteriores (Dourda *et al.*, 1994), o número de túbulos dentinários na região de dentina coronária aumentou significativamente da região média para a região profunda, próximo à polpa. Garberoglio e Brännström (1976) analisaram o número e o diâmetro de túbulos dentinários em dentes de indivíduos entre 8-25 e 40-60 anos. Não encontraram diferença significativa no número e diâmetro dos túbulos entre os dois grupos. O diâmetro médio variou de 2,0 a 3,2 μ m. O valor médio do volume tubular total em dentina coronária foi calculado como 10% em relação ao volume de dentina total. Este

valor próximo à polpa foi de 28% e próximo ao esmalte de 4%. O valor médio do diâmetro tubular a um milímetro da polpa foi de 1,6 μ m em dentina não desmineralizada e 2,4 μ m em dentina desmineralizada. Os valores correspondentes em dentina periférica foram de 1,1 μ m e 2,6 μ m. É evidente que a descalcificação aumenta o diâmetro dos túbulos por remoção de dentina peritubular. A permeabilidade dentinária pode estar relacionada ao número, diâmetro e área dos túbulos dentinários além de possíveis ramificações destes.

3.3. Estímulos que desencadeiam a Hipersensibilidade Dentinária

Os estímulos que provocam o surgimento da dor podem ter origem térmica, química ou mecânica. A queixa mais comum é a provocada por estímulos frios. A dor também pode acontecer por estímulos químicos, como os alimentos ácidos (principalmente frutas), doces e, raras vezes, salgados. O estímulo mecânico ocorre frequentemente, quando o paciente fricciona a escova durante a escovação desencadeando a dor. O ar atmosférico durante a respiração bucal, principalmente no inverno, que se associa ao frio ou ao ar da seringa tríplice por desidratação, conduz a dor (Sobral, 2003; Tonetto *et al.*, 2012).

O uso do estímulo tátil, ou seja, quando o clínico faz uso de uma sonda exploradora, para avaliar a sensibilidade apresenta uma limitação relacionada com a variabilidade na pressão exercida. Assim sendo, o diagnóstico realizado com esse método pode apresentar resultado falso negativo. Considerando estudos clínicos, é necessário aplicar a mesma pressão em todos os dentes testes e em todos os intervalos de tempo durante a pesquisa (Gillam, Newman, 2002). A pressão exercida sobre a superfície dentinária causa deslocamento interno do fluido dentinário, ativando os mecanorreceptores pulpaes. Ao se retirar a pressão, ocorre um recuo e conseqüentemente o movimento do fluido, gerando a hipersensibilidade (Bramante e Vale, 1996).

O estímulo osmótico ocorre quando uma solução de concentração diferente a do fluido dentinários é colocada sobre a superfície dentinária (Pashely, 1992, Kleinberg *et al.*, 2002, Gillam, Newman, 2002). As soluções hipertônicas tais como cloreto de sódio, glicose, sacarose e cloreto de cálcio geram este tipo de estímulo (Pashely 1992; Gillam, Newman, 2002). Nesta situação, o soluto transita para a solução menos

concentrada, movimentando o fluido dentinário e ativa os receptores pulpaes induzindo à dor (Pashely, 1992).

O estímulo térmico pode ser pelo calor ou frio. O calor aplicado ao dente causa dilatação do fluido dentinário, ativando os receptores pulpaes. O frio levaria a uma contração do fluido, promovendo assim a sensibilização nervosa (Pashely, 1992, Pashle, 1990, Kleinberg *et al.*, 2002).

O estímulo evaporativo, clinicamente aplicado pelo jato de ar, causaria movimentação e, conseqüentemente, evaporação do fluido e sua reposição ficaria por conta do tecido pulpar, levando à sensibilização (Kleinberg *et al.*, 2002)

Os testes elétricos utilizados para avaliar o grau de sensibilidade não são bem aceitos, podendo afetar diretamente os nervos pulpaes (Kleinberg *et al.*, 2002, Gillam, Newman, 2002). As fibras A (alta velocidade de condução) são ativadas com baixos níveis de corrente, enquanto que as fibras C (baixa velocidade de condução) são excitadas com altos níveis de corrente (Bramante, Vale, 1996). Portanto, algumas fibras nervosas são facilmente ativadas pelos testes elétricos, nem sempre demonstrando a real presença e intensidade da sensação dolorosa da HD.

Diversos pesquisadores estudaram os mecanismos sensitivos da dentina e da transmissão do impulso nervoso no órgão pulpar. De acordo com Palma *et al.*, (2005), muitas teorias têm sido propostas para explicar o mecanismo da hipersensibilidade da dentina: a presença de fibras nervosas interdentinárias; excitação de uma fibra nervosa através da sinapse com o odontoblasto; a excitação de uma fibra nervosa livre na polpa e a teoria hidrodinâmica de Brannstrom.

A Teoria Hidrodinâmica apresentada por Brannstrom na década de 1960 continua sendo a mais aceita para explicar a percepção da dor (Garone *et al.*, 2005). Segundo esta, o mecanismo de transmissão da dor, causando a hipersensibilidade dentinária ocorreria por meio do rápido movimento do fluido dentinário dentro dos túbulos em direção à polpa ou em sentido contrário, promovendo uma deformação mecânica das fibras nervosas que se encontram no interior dos túbulos ou na interface polpa dentina, que é transmitida como uma sensação dolorosa (Branstrom, 1986). Uma vez que a hipersensibilidade dentinária está associada às áreas de dentina exposta na região

cervical dos dentes, os túbulos dentinários envolvidos são estimulados por alterações de temperatura ou de pressão osmótica, ocorrendo um deslocamento do fluido intratubular. A movimentação no interior dos canalículos dentinários pode desencadear nas fibras nervosas da polpa, uma estimulação, que é representada pela sensação de dor (Silva et al., 2005; Shiau, 2012).

A Teoria Hidrodinâmica está baseada na premissa de que a dentina sensível é permeável (Brännström, 1992). Foi demonstrado que a dentina hipersensível apresenta numerosos túbulos dentinários abertos e amplos na superfície comparada com a dentina não sensível, a qual apresenta poucos túbulos abertos e com menor área e diâmetro (Absi et al., 1995). A hipersensibilidade da dentina ocorre devido a uma comunicação entre a superfície dentinária e a polpa subjacente, via túbulos dentinários (Brännström e Aström 1972). Baseado nesse fato, para o controle da dor que está presente devido à dentina exposta, seria racional promover a obliteração ou redução do diâmetro dos túbulos abertos.

3.4. Fatores Etiológicos da Hipersensibilidade Dentinária

Numerosos fatores podem levar à exposição dos túbulos dentinários, e, conseqüentemente, à hipersensibilidade dentinária. Entre eles pode-se citar: higiene oral inadequada e uso de abrasivos, técnica incorreta de preparo cavitário e/ou do método restaurador, exposição a ácidos não bacterianos, contato oclusal com força excessiva e contato oclusal prematuro (Aguilar *et al.*, 2005; Shiau, 2012).

É de fundamental importância o controle do paciente com relação à sua dieta e aos seus hábitos de escovação. Deve-se controlar a quantidade de ácidos ingeridos, assim como o intervalo entre a alimentação e a escovação. Qualquer tratamento pode falhar se esses fatores não forem controlados. Bebidas como vinho branco e vinho tinto, sucos cítricos, suco de maçã e iogurte são capazes de dissolver o "smear-layer", gerando sensibilidade dentinária. A perda da estrutura dentária aumenta caso a escovação dentária seja feita imediatamente após a ingestão de ácidos, devendo-se esperar um tempo providencial entre as duas ações (Rico, 1992).

As bebidas ácidas podem causar erosão na superfície da dentina, expondo e alargando seus túbulos, predispondo ao surgimento de hipersensibilidade dentinária

(Naylor *et al.*, 2006). Contatos prematuros ou exagerados assim como as interferências oclusais dos movimentos excursivos são, em muitos casos, responsáveis por sensibilidade dentinária devido à deformação e flexão do dente, resultando em fraturas de esmalte e exposição da dentina (Costa *et al.*, 2003).

Vários procedimentos restauradores, ao se comportarem como estímulos, podem desencadear a sensibilidade dentinária: instrumentos rotatórios cortantes mal refrigerados, cavidade quando é seca para inserção de materiais e permanece desidratada por período prolongado, pressão exercida sobre as paredes cavitárias, aplicação do condicionamento ácido ou de materiais resinosos por diferença de pressão osmótica ou pela ação desidratante da evaporação do solvente do primer do adesivo (Garone *et al.*, 2005).

Segundo Aguiar (2005), a terapia periodontal tem sido associada à hipersensibilidade devido à remoção de cálculos supra e/ou subgengivais, o que expõe os túbulos dentinários.

Dois processos são essenciais para o desenvolvimento da hipersensibilidade dentinária: a dentina deve estar exposta por perda de esmalte ou recessão gengival, e os túbulos dentinários devem estar abertos tanto para a cavidade oral quanto para a polpa (Barbosa *et al.*, 2005).



Figura 4. Lesão cervical não cariiosa em caninos e pré-molares
<http://studiogorga.blogspot.com.br/2012/05/hipersensibilidade-dentinaria.html>

3.5. Tratamentos propostos para Hipersensibilidade Dentinária

Segundo Conceição (2007), para que se possa estabelecer um correto diagnóstico e, conseqüentemente, a escolha do tratamento mais adequado, alguns procedimentos clínicos prévios podem ser adotados:

Anamnese: levantamento de dados sobre sua história médica e odontológica pregressa, analisando-se, também, as descrições das características da dor pelo paciente.

Exame Clínico: observação da presença de lesões de cáries, restaurações defeituosas, elementos fraturados e/ou trincados, além de exame periodontal verificando presença de recessões, mobilidade dental e qualidade da escovação.

Análise da Oclusão: para identificar sinais de trauma oclusal, hábitos parafuncionais e registro do padrão oclusal atual do paciente.

Testes e exames Complementares: realizando percussão, palpação, sondagem periodontal, radiografias e testes de sensibilidade pulpar.

Um diagnóstico correto é de suma importância, já que, segundo Sobral (2003) e Silva (2005), a sensibilidade dentinária pode ser confundida com outras condições dentárias que causam sintomas similares (síndrome do dente rachado, fraturas de restaurações, cáries, sensibilidade pós-operatória, traumatismo oclusal e processos inflamatórios reversíveis ou até irreversíveis).

Existem diferentes formas de tratamento para a HD, como o uso de agentes antiinflamatórios, oclusão dos túbulos dentinários, agentes que bloqueiam a resposta neuronal e recobrimento radicular (Arrais *et al.*, 2004; Oberg *et al.*, 2006). Os agentes dessensibilizantes que obliteram os túbulos dentinários podem alterar o conteúdo tubular, por meio da precipitação de proteínas e cristais de cálcio na entrada ou no interior dos túbulos, ou simplesmente podem atuar por preenchimento. Entretanto, o exato mecanismo destes agentes dessensibilizantes ainda não é bem compreendido (Ritter *et al.*, 2006; Arrais *et al.*, 2004). Um grande número de casos de HD pode ser tratado simplesmente com o uso de dentifícios dessensibilizantes, os quais contêm

alguns agentes ativos, como flúor, sais de cloreto e de estrôncio e nitrato de potássio (Arrais *et al.*, 2003). A incorporação de agentes dessensibilizantes nos dentifrícios tem como principal objetivo facilitar o tratamento da HD, já que estes são utilizados diariamente pela população (Wara-aswapati *et al.*, 2005; Tonetto *et al.*, 2012).

Os pacientes que apresentam dentes sensíveis devem ser submetidos primeiramente a uma terapia dessensibilizante, evitando a intervenção restauradora ou mutiladora (endodontia ou exodontia); contudo, se houver perda de estrutura dental, deve-se optar pelo uso de resinas compostas ou materiais ionoméricos (Barbosa *et al.*, 2005).

Realizar exame clínico, diagnóstico correto e optar por um agente dessensibilizante eficaz são as chaves para o sucesso frente ao tratamento da hipersensibilidade dentinária. Além disso, os fatores que levam a exposição dentinária e consequente hipersensibilidade devem ser controlados e/ou eliminados através da orientação da dieta, instruções de escovação e ajuste oclusal, para que, assim, um tratamento eficaz seja realizado (Aranha *et al.*, 2004).

Tentativas para reduzir a HD têm sido buscadas através da redução da excitabilidade das fibras nervosas dentro da polpa ou obliterando os túbulos dentinários abertos (Wara-aswapati *et al.*, 2005; Arrais *et al.*, 2004; Sowinski *et al.*, 2001). Até o momento, o tratamento da HD ainda não está bem estabelecido (Naylor *et al.*, 2006).

As técnicas para o tratamento utilizadas atualmente são apenas de natureza transitória e os resultados não são sempre previsíveis (Pradeep *et al.*, 2010). Os dois métodos principais de tratamento da hipersensibilidade dentinária é a oclusão tubular e o bloqueio da atividade nervosa.

Uma vasta gama de produtos com diferentes níveis de eficácia estão disponíveis para tratar a estrutura de dentes sensíveis, no entanto, a reaplicação regular destes produtos é necessária e nenhum tem sido demonstrado confiável para eliminar completamente a hipersensibilidade. Apresentam efeitos de curta duração por ocluírem os túbulos com materiais que não são constituintes de dentina natural (Curtis *et al.*, 2010).

Vários agentes foram formulados para o tratamento da hipersensibilidade dentária. No entanto, não há atualmente nenhum sistema ideal para realizar esta tarefa. Oxalato de potássio, cloreto de potássio, o glutaraldeído, monômeros de resina, e outros materiais têm sido utilizados em dentifrícios para ocluir túbulos dentinários. Embora estes materiais tenham proporcionado algum alívio, nenhum foi provado ser totalmente eficaz (Mitchell *et al.*, 2011).

É evidente que existem diversos tratamentos propostos na literatura, sendo que todos apresentam efetividade em diferentes graus e tempo (Aguiar *et al.*, 2005). O grande desafio para vencer a hipersensibilidade dentinária e encontrar uma terapêutica que elimine efetivamente a sensação dolorosa e não cause recidiva com o passar do tempo (Almeida *et al.*, 2006; Shiau, 2012; Tonetto *et al.*, 2012).

O cirurgião dentista pode oferecer tratamentos de eficácia limitada, como agentes dessensibilizantes, associados com cuidados caseiros como dentifrícios especialmente formulados para o tratamento da HD. Porém, além do tratamento, deve considerar os fatores etiológicos e predisponentes que geraram a HD como dieta ácida ou trauma de escovação, e orientar os pacientes quanto a esses procedimentos (Bánóczy, 2002; Camps, Pashley, 2003, Shiau., 2012).

Os agentes dessensibilizantes com modo de ação baseado na obliteração dos túbulos dentinários podem ser representados pelos produtos a base de hidróxido de cálcio e flúor; e são bastante utilizados pela facilidade de uso e custo. O pH alcalino e os íons do hidróxido de cálcio podem facilitar o depósito de fosfato de cálcio dentro dos túbulos dentinários. A principal desvantagem é a baixa solubilidade. Paralelamente ao tratamento com hidróxido de cálcio, deve-se controlar a ingestão de ácido, pois este inativa a ação do Ca(OH)_2 (Siqueira, 2011).

A aplicação tópica de flúor, sob a forma de fluoreto de sódio, sobre a dentina exposta também tem sido sugerida como forma de tratamento da hipersensibilidade. A vantagem deste tratamento está relacionada com o custo do produto, entretanto é necessária a aplicação supervisionada pelo cirurgião-dentista. O mecanismo se dá pela formação de cristais de fluoreto de cálcio na superfície de dentina. Entretanto, os cristais formados são menores do que o diâmetro dos túbulos dentinários, o que implica na necessidade de repetição da aplicação desse produto. Além disso, o

composto de fluoreto de cálcio é extremamente instável, dissociando-se rapidamente e fazendo com que o seu efeito seja de pouca duração (Aranha *et al.*, 2004; Trushkowsky *et al.*, 2011).

O tratamento com dentifrício tem sido amplamente indicado, principalmente por ser de baixo custo, de fácil uso e poder ser aplicado na própria casa do paciente (Aguiar *et al.*, 2005).

Procedimentos tais como escovação e utilização de pastas com componentes abrasivos podem modificar a morfologia de superfícies dentinárias expostas, em especial da dentina cérvico radicular. Alguns estudos que avaliaram a oclusão tubular por dentifrícios observaram que o bloqueio e a redução do lúmen dos túbulos podem ocorrer tanto como um resultado da deposição de flúor, quanto de sais insolúveis ou ação abrasiva dos dentifrícios (Leme *et al.*, 2004).

O uso de um dentifrício com nitrato de potássio ou cloreto de estrôncio tem apresentado resultados favoráveis em estudos clínicos controlados na redução da HD (Drisko, 2002; Prati *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 1997; Shiau, 2012). Os sais de potássio são efetivos para o tratamento da HD quando aplicados na forma tópicas ou dentifrícios (Wara-aswapati *et al.*, 2005, Sowinski *et al.*, 2001; Suge *et al.*, 1995; Stead *et al.*, 1996). Cristais de sais de potássio podem ser encontrados cobrindo túbulos dentinários, sobre a dentina intertubular e peritubular, porém, após 7 dias imersos em saliva artificial a quantidade de cristais diminuiram (Suge *et al.*, 1995).

A concentração de íons potássio é influenciada por fatores importantes, incluindo a concentração do gradiente de íons potássio ao longo dos túbulos, a razão do escoamento de fluido tubular e a permeabilidade da barreira entre a polpa e o túbulo (Stead *et al.*, 1996). O gel de oxalato de potássio pode agir através da sua capacidade de penetrar nos túbulos e reagir com íons cálcio do fluido dentinário para formar cristais de oxalato de cálcio insolúveis (Gillam *et al.*, 2002), podendo agir também pela despolarização de fibras nervosas. A precipitação pode ocorrer dentro dos túbulos dentinários, estendendo até 15µm de profundidade (Arrais *et al.*, 2004, Gillam *et al.*, 2002).

Suge *et al.* (1995), em um estudo *in vitro* analisou discos de dentina tratados com fluoreto de sódio 2%, oxalato de potássio 25% e cloreto de estrôncio a 10%, aplicados durante 3 minutos, imersos em saliva artificial e mantidos a 37°C. O fluoreto de sódio e o cloreto de estrôncio não foram capazes de diminuir a permeabilidade dentinária. Muitos estudos avaliaram os componentes dos cristais presentes sobre a dentina intertubular, peritubular ou ocluindo os túbulos dentinários após a utilização de escovação com diferentes dentifrícios, e observaram pequena quantidade dos agentes dessensibilizantes e maior quantidade dos agentes abrasivos (Oberge *et al.*, 2006; Kodaka *et al.*, 2001). As partículas abrasivas dos dentifrícios também podem bloquear e cobrir os túbulos, ou em adição com a escovação, podem formar smear layer. Porém, estudos *in vitro* observaram que essas partículas abrasivas podem ser perdidas facilmente através de água e principalmente de bebidas ácidas. A sílica artificial parece resistir à dieta ácida por 60 min (Oberge *et al.*, 2006).

A oclusão dos túbulos dentinários é uma abordagem atualmente utilizada no tratamento da HD, e vários produtos com produtos ativos têm se mostrado a oclusão dos túbulos *in vitro*. Embora existam vantagens em termos de facilidade, disponibilidade e custo (ao consumidor), uma grande desvantagem é que eles podem levar até 2-4 semanas para atingir um início de eficácia no alívio dos sintomas da HD (Lynch *et al.*, 2011).

Chiang (2010) estudou um biomaterial composto de sílica mesoporosa e nanopartículas de óxido de cálcio para ocluir túbulos dentinários e reduzir consideravelmente a permeabilidade da dentina, mesmo na presença da pressão pulpar, devido à precipitação de fosfato de cálcio.

Recentemente, uma pasta contendo nanocristais de hidroxiapatita sintética (carbonato de hidroxiapatita) foi estudada e observou-se a sua capacidade de remineralizar superfícies de esmalte desmineralizadas (Orsini *et al.*, 2010).

Dessensiv[®] é um gel dessensibilizante dentinário utilizado para o tratamento da sensibilidade dentinária pela redução da capacidade do nervo de transmitir a dor através de sua despolarização pela ação do nitrato de potássio e a obliteração dos túbulos dentinários pela ação do oxalato de potássio e do fluoreto de potássio.

Em 2002, Kleinberg desenvolveu um material para reduzir a sensibilidade com base no papel natural da saliva em reduzir a sensibilidade. A saliva geralmente permite que íons de cálcio e fosfato migrem para os túbulos de dentina e formem um precipitado de glicoproteínas salivares e fosfato de cálcio que oclui os túbulos (Panagakos *et al.*, 2009). O material desenvolvido por Kleinberg consistiu de arginina, que é um aminoácido que tem uma carga positiva no pH fisiológico; bicarbonato como um tampão de pH, e carbonato de cálcio, que fornece uma fonte de cálcio. Este material foi capaz de ligar e selar túbulos dentinários expostos e diminuir a sensibilidade. Kleinberg (2002) relatou que a pasta contendo arginina associada ao carbonato de cálcio proporcionou um alívio da dor durante 28 dias. A microscopia de força atômica demonstrou que os túbulos foram ocluídos (Cummins, 2009).

Muitos trabalhos relacionados ao tratamento da hipersensibilidade dentinária tem sido encontrados na literatura e alguns produtos já estão sendo comercializados. Um exemplo é a pasta Colgate sensitive pró-alívio[®] que apresenta em sua composição carbonato de cálcio e arginina e que foi testada e analisada por Petrou *et al.*, 2009. Pesquisas recentes sugerem que a arginina e o carbonato de cálcio da fórmula, que são carregados positivamente em pH fisiológico, se ligam à superfície da dentina, carregada negativamente, e ajudam a formar uma camada rica em cálcio na superfície da dentina e no interior dos túbulos dentinários, selando-os. A arginina provoca oclusão dos túbulos dentinários. Esta oclusão permanece intacta mesmo depois de exposição a ácidos, evitando a transmissão dos estímulos causadores da dor.

Os estudos mais recentes relatam o grande potencial da utilização do vidro bioativo para o tratamento da hipersensibilidade dentinária. Sendo assim, na próxima sessão será apresentada uma revisão sobre o vidro bioativo.

Vidros bioativos em dentifrícios remineralizante para o tratamento de HD já foram previamente testados e demonstraram ocluir o tubulos dentinários através da formação de HAC. A caracterização *in vitro* da capacidade formação de apatita dos novos vidros bioativos é, portanto, importante na investigação de seu potencial de uso em dentifrícios remineralizante (Lynch *et al.*, 2011).

3.6. Vidro Bioativo

3.7.1. Conceito e histórico vidro bioativo

Nos últimos 40 anos tem havido um grande avanço no desenvolvimento de materiais médicos e odontológicos feitos com cerâmicas. Este interesse se alicerça nas vantagens deste material incluindo sua resistência à compressão, sua resistência ao desgaste, por ser isolante térmico, entre outras (Hench, 1989).

O termo bioativo foi definido como “um material que extrai uma resposta biológica específica na sua interface resultando na formação de uma união entre os tecidos e o material”. As partículas de vidro bioativo (VB) são cerâmicas bioativas que foram inicialmente desenvolvidas pelo Dr. L. Hench nos anos 70 (Hench, 1988, 2006).

Hoje, já é de conhecimento que outros materiais também podem ser bioativos, como, por exemplo, novas composições de vidros, vitrocerâmicas e as cerâmicas da família dos fosfatos de cálcio (Kokubo *et al.*, 2008).

Os materiais bioativos apresentam a característica de formar uma ligação com o tecido ósseo e, em alguns casos, com outros tecidos moles. A ligação com o osso está associada com a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) na superfície do material bioativo. A fase de HAC formada é similar em composição e estrutura à fase mineral do osso e é esta equivalência que é responsável pela ligação interfacial (Hench, 1988).

A parte mineral dos ossos e dentes é composta pela forma cristalina do fosfato de cálcio similar a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Em relação à composição, as apatitas biológicas são sempre deficitárias de cálcio ou carbonatadas, sendo então chamadas de hidroxiapatitas carbonatadas (Vallet –Regí, 2001).

Vidros bioativos são conhecidos por sofrerem reações de superfície e formarem uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) na superfície quando exposta a fluidos corporais. Estes vidros têm sido extensivamente estudados na literatura e têm sido utilizados como substituto ósseo à medida que promovem a formação óssea e osseointegração (Shapoff *et al.*, 1997).

As etapas que ocorrem até a formação da camada de HAC estão representadas na figura 5 e podem ser resumidas em: (i) lixiviação e formação de grupos silanol (Si-OH); (ii) Perda de sílica solúvel ($\text{Si}(\text{OH})_4$) e formação de silanol; (iii) policondensação de silanois para formar um gel de sílica hidratada; (iv) formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfa; (v) cristalização de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (Shapoff et al., 1997).

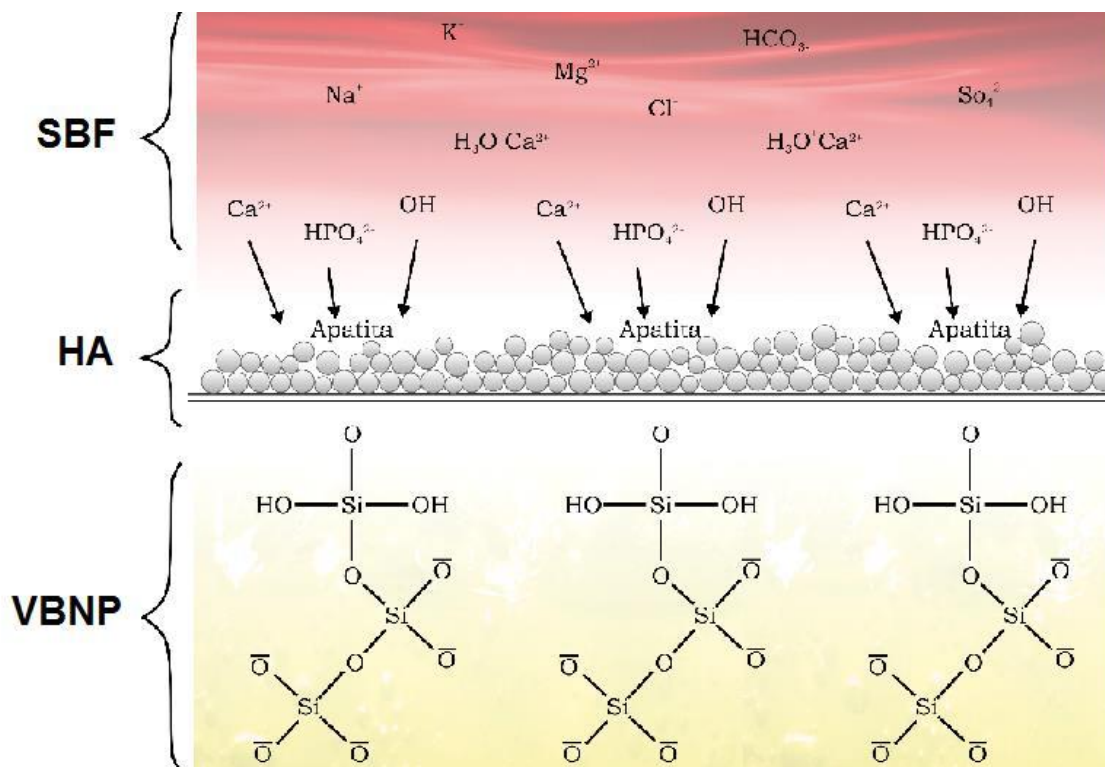


Figura 5. Desenho esquemático da formação de hidroxiapatita

3.7.2. Composição, características, aplicações e síntese

A composição do VB selecionada pelos pesquisadores, por obter um melhor desempenho ao se ligar ao tecido ósseo, é de 45% de dióxido de silício (SiO_2), 24,5% de óxido de cálcio (CaO), 24,5% de óxido de sódio (Na_2O) e 6% de pentóxido de difósforo (P_2O_5) por peso. Além da vantagem de o VB apresentar uma forte adesão com os tecidos vivos, tanto ósseos como conjuntivos, possui um módulo de

elasticidade similar ao osso e ainda previne uma encapsulação fibrótica na interface do material quando implantado (Bosshardt *et al.*, 2005).

Os vidros bioativos estão sendo muito utilizados em processos regenerativos periodontais para o tratamento de defeitos ósseos devido às propriedades osteocondutoras e osteogênicas e do potencial para adesão e neoformação óssea. Tais produtos incluem PerioGlas (NovaBone Osteobiologics, FL, EUA), NovaMin (NovaMin Technology Inc., FL, EUA) e Bio-Oss (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) (Nourmohammadi *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, materiais de vidro bioativo foram introduzidos em muitos campos da odontologia. Este material exclusivo tem inúmeros novos recursos, o mais importante dos quais são a sua capacidade de agir como um remineralizador biomimético, e ativar sinais celulares de forma a beneficiar a restauração da estrutura e da função dos tecidos. Vidro bioativo é considerado um grande avanço na tecnologia de remineralização, é um composto inorgânico multi-componente constituído por elementos tais como silício, cálcio, sódio e fósforo. O ingrediente ativo amorfo são os fosfosilicatos de sódio e cálcio. Estes compostos em um ambiente aquoso liberam íons cálcio, sódio e fosfato que contribuem para o processo de remineralização (Wefel, 2009).

Ahamed (2014) investigou a eficácia de vidro bioativo para a remineralização do esmalte desmineralizado por lesão cáriosa artificial, e obteve resultados que confirmam o conceito do vidro bioativo como um agente remineralizante eficaz. O que apresenta uma grande relevância clínica, principalmente ao focar na importância do tratamento minimamente invasivo para lesões de cárie incipientes por remineralização.

Um aspecto que o torna diferente de outras biocerâmicas é a possibilidade de se controlar suas propriedades químicas e suas ligações com os tecidos, sendo possível obter vidros com propriedades específicas para uma aplicação particular. Isso também pode ser obtido em algumas vitro cerâmicas, mas sua microestrutura heterogênea restringe sua versatilidade (Hench, 1988).

Vidros tri-componente 60% SiO₂-36% CaO-4% P₂O₅ foram estudados na forma densa e em pó e apresentaram altos níveis de bioatividade com excelente potencial para aplicação em engenharia de tecido (Ohgushi *et al.*, 1999).

Modificações na formulação dos vidros bioativos podem alterar os produtos iônicos e permitir que a solubilidade e a taxa de desenvolvimento de tecido mineralizado seja otimizada para os requisitos de uma aplicação específica (Nourmohammadi *et al.*, 2008). Por isso, neste trabalho, diferentemente dos demais estudos que avaliaram a eficácia do vidro bioativo para a oclusão dos túbulos dentinários, será utilizado o vidro bioativo tri-componente.

Existem dois tipos de rotas de obtenção do vidro bioativo, um produzido pela rota tradicional de fusão de precursores do vidro e outro produzido pela rota sol-gel. Vidros bioativos produzidos pela rota sol-gel tendem a ser mais bioativos (Pereira *et al.*, 1994, 2005).

O processo sol-gel (SG) consiste num método físico-químico de síntese de óxidos cerâmicos em que ocorre a evolução de um sol (dispersão líquida de partículas coloidais que são partículas sólidas de diâmetro inferior a 100nm) para um material poroso, onde partículas maiores interconectam-se para formar uma rede sólida semelhante a uma esponja. Esse processo diferencia-se em relação aos demais pela possibilidade de preparação de géis com o mesmo grau de homogeneidade da solução inicial. Outra vantagem que contribui para o crescente interesse do método SG é a facilidade de modelar os géis, permitindo a obtenção de corpos cerâmicos com formato pré-definido (Pereira *et al.*, 1994, 2005).

O processo sol-gel consiste basicamente na transformação de um sol, suspensão coloidal de partículas sólidas em um líquido, em um gel. A diferença entre um sol e uma solução reside no fato de que a solução é um sistema de uma única fase, enquanto que um sol é uma suspensão de uma fase sólida em uma fase líquida. Em um sol, as partículas coloidais são tão pequenas, da ordem de 1 a 100nm, que as forças gravitacionais são desprezíveis e as interações são dominadas por forças de pequena ordem, tais como atração de Van der Waals e cargas superficiais. A formação de um gel coloidal ou particulado é resultado da diminuição da carga superficial das partículas suspensas, que perdem a sua mobilidade através da sua

interconexão, dando origem a uma rede tridimensional rígida e porosa, conhecida como gel. Os géis podem ser obtidos também pelo controle da polimerização de um composto precursor hidrolisado, resultando em um gel polimérico, uma única molécula que alcança dimensões macroscópicas de forma a se estender através da solução. Um gel úmido então é uma substância que contém um esqueleto sólido contínuo cercado de uma fase líquida. No processo sol-gel, os precursores usados para a preparação do colóide consistem de um elemento metálico rodeado por vários ligantes não metálicos. Os precursores podem ser inorgânicos ou orgânicos, os mais usados são os alcóxidos metálicos por reagirem facilmente com a água por hidrólise. Os alcóxidos mais extensamente estudados são os de silício, como o tetraetilortossilicato (TEOS) (Brinker *et al.*, 1990).

O PEG será utilizado neste trabalho como surfactante e dispersante por ser facilmente dissolvido em água, de baixo custo e muito utilizado e relatado na literatura. Será utilizado para obtenção de nanopartículas esféricas e para controle do tamanho das partículas.

Uma elevada área superficial, rica em sílica, é determinante para a formação da camada de HAC, levando os pesquisadores a utilizarem o processo sol-gel para criar vidros bioativos com áreas superficiais muito mais elevadas que os vidros produzidos pelo processo de fusão dos componentes. A composição e estrutura dos VBs produzidos pelo método sol-gel tem um efeito significativo em sua morfologia e taxa precipitação de microcristais HAC formados sobre sua superfície (Langer *et al.*, 2000).

A sílica é o componente chave na maioria dos vidros bioativos e sua dissolução atua como um local de nucleação para precipitação de íons cálcio e fosfato para formar hidroxiapatita. A sílica também determina a solubilidade e a quantidade de íons ativos e atua como um estabilizador do sistema. A dissolução da rede de silicato provoca a liberação dos constituintes iônicos em solução, formando uma solução supersaturada nas suas imediações, resultando na eventual nucleação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo, que se transforma em apatita que está firmemente ligada ao tecido mineralizado (Curtis *et al.*, 2010).

3.7.3. Vidro bioativo e hipersensibilidade dentinária

Na área da odontologia, os vidros bioativos têm potencial para promover a remineralização da dentina e do esmalte (lixiviados pelos ácidos secretados pela ação das bactérias), proteção contra novas cáries (ação bactericida dos íons Ca^{2+}) e ação dessensibilizante (oclusão dos túbulos dentinários abertos pela desmineralização da dentina) (Chow *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2000).

Os vidros bioativos de silicato são de interesse para utilização como enxertos ósseos, recobrimento, cimentos ósseos e até mesmo em dentífricos, e em todas essas aplicações a adição de fluoreto seria benéfica. O flúor é bem conhecido por prevenir as cáries dentárias pela remineralização do esmalte e da dentina e inibindo a desmineralização pela ação de enzimas bacterianas (Thuy *et al.*, 2008).

Como um biomaterial, o vidro bioativo tem sido utilizado em odontologia ao longo das últimas quatro décadas. Esta classe de compostos de cerâmica de vidro foi desenvolvido como um material de reparação óssea e regeneração em ortopedia maxilofacial e aplicações periodontal (Shiau H.J., 2012).

Uma aplicação do vidro bioativo na odontologia é como um componente remineralizante para dentífricos, particularmente para tratar a hipersensibilidade dentinária (Du *et al.*, 2008). A ação do vidro bioativo no tratamento da HD é a oclusão dos túbulos dentinários abertos. Este biomaterial induz a precipitação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada que bloqueia os túbulos (Shiau H.J., 2012).

Um creme dental contendo vidro bioativo com uma grande fração de partículas pequenas o suficiente para penetrar nos túbulos dentinários, e em seguida ocluir os túbulos pela formação de HAC, atuaria como um importante veículo para reduzir a sensibilidade dentinária.

Outros estudos já avaliaram e relataram o benefício da incorporação do flúor ao vidro bioativo. Contudo foram utilizados vidros bioativos sintetizados pela técnica de fusão e com composição diferente da que será avaliada neste trabalho, além de não terem sido obtidas e avaliadas partículas em escala nanométrica. (Lynch *et al.*, 2011; Brauer *et al.*, 2010, 2011, 2012).

A formação de fluorapatita (FAP), em vez de HAC é preferível, por ser quimicamente mais estável em pH mais baixo e, portanto, seria menos prontamente dissolvida quando exposta a condições ácidas da boca (por exemplo, durante o consumo de suco de frutas e bebidas gaseificadas). Recentemente, demonstrou-se que o vidro bioativo contendo fluoreto é capaz de formar FAP em fluido corporal simulado (SBF) (Brauer *et al.*, 2010).

Os íons cálcio e flúor são conhecidos por serem benéficos para a remineralização e fortalecimento do tecido dentário. O flúor também funciona como um agente contra a presença *Streptococcus mutans* (microorganismo responsável pelo desenvolvimento da doença cárie) na cavidade oral. Sendo assim, o desenvolvimento de novos materiais que liberem esses íons na superfície dental ao invés de apenas aumentar a concentração destes íons na saliva é de grande utilidade, pois seus efeitos são maximizados quando os íons estão localizados na superfície do dente que está vulnerável à desmineralização (Davis *et al.*, 2014).

Outra vantagem da incorporação do flúor no vidro bioativo, que foi relatada por Brauer (2011) é a redução na temperatura de transição vítrea (T_g) com o aumento de CaF_2 . A T_g é determinada pela força de adesão no vidro, e também está correlacionada com a dureza dos vidros bioativos, que pode influenciar na abrasividade de um dentífrico contendo vidro bioativo. Um vidro bioativo com menor dureza do que o esmalte (aproximadamente 4GPa) é desejável, e a variação na concentração do flúor no vidro é uma opção interessante para ajustar a dureza e abrasividade do VB.

Gentleman (2013) pesquisou o comportamento de VB sintetizados pela rota de fusão incorporando níveis crescentes de flúor e mantendo a sua estrutura de silicato constante frente a osteoblastos humanos *in vitro*. Os resultados demonstraram que, enquanto a proliferação das células foi maior nos VB contendo baixo teor de flúor, os marcadores de diferenciação e mineralização foram maiores nos VB com os maiores teores de flúor, um provável efeito de uma combinação de efeitos de superfície e liberação de íons. Além disso, os osteoblastos expostos aos produtos da dissolução do VB contendo flúor apresentaram aumento da atividade da fosfatase alcalina, um marcador para a mineralização óssea, sugerindo que o flúor pode direcionar a diferenciação dos osteoblastos. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que

o VB pode liberar níveis terapêuticos de flúor e isto pode levar a sua utilização numa variedade de aplicações de regeneração óssea.

Curtis (2010) comparou a eficácia de um pó de biovidro sintetizado por fusão com micropartículas com morfologia irregular com a de um pó de biovidro com nanopartículas esféricas obtidas pelo método sol-gel para ocluir túbulos dentinários expostos e para promover a remineralização pela formação de apatita. Foi observado que o tratamento utilizando as nanopartículas apresentou uma maior formação de hidroxiapatita no interior dos túbulos.

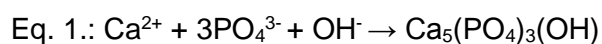
A principal aplicação para estes novos vidros bioativos contendo flúor é como aditivo remineralizante de dentifrícios. O vidro bioativo contendo flúor como componente do dentifrício precisa formar a FAP antes de ser lavada pela ação da saliva. Idealmente deve-se formar a FAP na boca em 8 horas, correspondendo a um período noturno, onde o fluxo salivar será mínimo. Não é indicada a incorporação também de fluoretos (como fluoreto de sódio, fluoreto de amônio ou monofluorofosfato de sódio), pois, o sal de flúor solúvel provoca uma alta concentração de flúor antes que a concentração de cálcio seja aumentada pela dissolução do vidro e, portanto, aumenta a probabilidade de resultar em formação indesejável de fluorita (CaF_2), que podem inibir ou competir com a formação FAP subsequentes. Portanto, é preferível liberar os íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- simultaneamente, de forma adequada para formar FAP a partir de uma composição de vidro única, a fim de evitar uma possível formação de CaF_2 (Mneimne *et al.*, 2011; Brauer *et al.*, 2012).

O Biosilicato® é uma vitrocerâmica totalmente cristalina produzida pela modificação da estrutura e concentração dos componentes do biovidro inicial por meio de um tratamento térmico que resulta na formação de microestruturas policristalinas. Essa inovação permitiu partículas com menor potencial cortante e comprovadas propriedades biológicas, o que permitiu seu uso no tratamento da HD e em outras áreas da saúde como reparador ósseo (Roriz *et al.*, 2010).

Tirapelli (2007) avaliou comparativamente, *in vitro* e *in vivo*, a eficácia do Biosilicato® (vitrocerâmica bioativa) frente a agentes dessensibilizantes disponíveis no mercado no tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical com dentifrício dessensibilizante Sensodyne®; gel com Biosilicato® a 1%; Biosilicato® misturado à água destilada 10%

e do produto Sensikill® (dessensibilizador dentinário contendo uma solução de fosfato de potássio e uma com cálcio). A avaliação comparativa mostrou que o Biosilicato®, na apresentação em gel ou misturado à água destilada foi o produto que apresentou maior redução da dor no menor tempo, ou seja, ação mais rápida.

NovaMin® é uma marca de um vidro bioativo particulado que está sendo usado em produtos odontológicos para remineralização dos dentes. Ele foi desenvolvido e patenteado pela NovaMin® Technology, Inc.. O Novamin proporciona sílica e íons de cálcio, fósforo, e de sódio que são necessários para a mineralização do osso e do dente. Partículas de NovaMin® se ligam à superfície do dente e, quando a partícula entra em contato com a saliva e água liberam os íons cálcio e fosfato. Sendo assim, uma camada de fosfato de cálcio se forma e cristaliza como hidroxiapatita. A reação química (Eq. 1) que leva à formação da hidroxiapatita é:



Esta tecnologia está sendo comercializada como Sensodyne Repair & Protect®.

Partículas de vidros bioativo com diferentes concentrações de flúor e outros elementos foram avaliadas por Brauer (2012). Os vidros bioativos que continham flúor formaram apatita após 6 horas, enquanto o controle sem flúor não formou apatita em 7 dias. Os vidros ocluíram os túbulos dentinários por formação de cristais de apatita e também liberou terapeuticamente íons ativos, como estrôncio e flúor para prevenção de cáries, zinco para propriedades bactericidas, e potássio que também é usado como um agente dessensibilizante em dentifrícios.

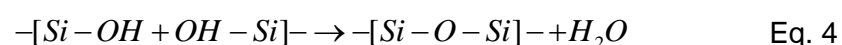
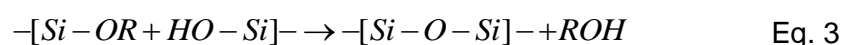
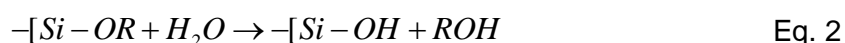
3.7.4. Nanopartículas de vidro bioativo

Em dimensões nanométricas, os vidros bioativos podem ter suas características imensamente aumentadas. Materiais em nanoescala apresentaram maior biocompatibilidade (Ostomel *et al.*, 2006) e bioatividade (Webster *et al.*, 2000) em comparação com vidros bioativos em microescala. Sua maior área superficial pode formar uma interface mais coesa em compósitos de matriz polimérica e, portanto, possibilitam o desenvolvimento de materiais com altas performances em propriedades mecânicas (Webster *et al.*, 2000). Além disso, o tamanho diminuto facilitaria a dispersão do vidro em formulações cosméticas e a difusão através da superfície da

pele e em regiões da boca pouco acessíveis durante a escovação e até mesmo durante a limpeza profissional (Chow *et al.*, 2001).

Estudos reportam a preparação de nanopartículas de vidro bioativo pelo método sol-gel em emulsões (co-precipitação), através do controle das concentrações dos alcóxidos, catalisadores e pH (Ostomel *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2004). Ao controlar tais parâmetros, ao invés de se produzir géis silicatos poliméricos, como ocorre normalmente na produção de vidros densos e espumas, pode-se obter partículas com dimensões nanométricas (Ostomel *et al.*, 2006).

Géis silicatos poliméricos são produzidos por reações de hidrólise e condensação aquosa do precursor alcóxido. A reação de hidrólise substitui um grupo alcóxido (OR) por um grupo hidroxila (OH) (Eq. 2). Duas moléculas hidrolisadas parcialmente podem se ligar em uma reação de condensação envolvendo grupos silanol (*Si-OH*) para produzir ligações siloxanas (*Si-O-Si*) mais água ou álcool como subproduto (Eq. 3 e 4).



Tais reações podem continuar pelo processo de polimerização do alcóxido, resultando em um polímero ramificado. Por outro lado, sob certas condições, como baixa concentração de água, as reações de hidrólise incompletas podem capacitar a condensação, resultando em cadeias poliméricas com braços relativamente pequenos. Altas concentrações de água favorecem a hidrólise e inibem a condensação, uma vez que a água é um produto dessa reação (Ostomel *et al.*, 2006).

A natureza do catalisador, ácido ou básico, influencia fortemente a cinética de reação, assim como a estrutura final do gel. Se a hidrólise for catalisada por base, a reação deve se processar através de uma substituição nucleofílica, e a velocidade de hidrólise será maior que a velocidade de condensação, levando à formação de cadeias mais ramificadas no início do processo. Se a hidrólise for catalisada por ácido, vai ocorrer

uma reação eletrofílica, e a velocidade da condensação será maior que a da hidrólise, levando à formação de cadeias mais longas e menos ramificadas no início do processo (Ostomel et al., 2006).

O processo de polimerização pode ser dividido em três domínios de pH: pH abaixo de 2, entre 2 e 7 e acima de 7. Esses domínios são estabelecidos de acordo com as características superficiais da sílica como o ponto de carga zero (PCZ), onde a carga superficial é zero, e o ponto isoelétrico (PIE), onde a mobilidade das partículas da sílica é zero, ambos na faixa de pH entre 1 e 3. O limite de pH igual a 7 aparece porque tanto a solubilidade como a taxa de dissolução são maximizadas e porque as partículas de sílica são ionizáveis apreciavelmente acima desse valor de pH, de forma que o crescimento das partículas ocorre sem agregação ou gelificação (Ostomel et al., 2006).

Abaixo do pH 2, a formação e a agregação de partículas primárias ocorrem simultaneamente, as partículas carregam pouca carga, o que permite a colisão entre elas, dando origem a cadeias e, posteriormente, a um sólido tridimensional.

Em pHs entre 2 e 7, a polimerização ocorre entre espécies condensadas, uma vez formados os dímeros, eles reagem preferencialmente com monômeros para formar trímeros e, que tornam a reagir para formar tetrâmeros. O crescimento e agregação ocorrem por contínua adição de moléculas pequenas às moléculas mais condensadas, formando cadeias e, por fim, uma rede tridimensional.

Acima do pH 7, as partículas são carregadas negativamente e repelem-se mutuamente. Assim sendo, elas não colidem, proporcionando um crescimento das partículas sem agregação. A taxa de crescimento dessas partículas está ligada às suas solubilidades, que dependem da sua distribuição de tamanho. Como partículas pequenas são mais solúveis do que as grandes, têm-se uma tendência geral de crescimento do tamanho médio das partículas e uma diminuição no seu número total.

Stober (1968) relatou um método pioneiro para a síntese de nanopartículas de sílica, esféricas e monodispersas, a partir do alcóxido tetraetil ortosilicato (TEOS) na presença de amônia, com tamanhos variando de 10 nm a pouco mais de 1 μm e distribuição granulométrica estreita. Cinco parâmetros desempenham um papel

importante no tamanho e na distribuição de tamanho de nanopartículas de sílica: (i) concentração do alcóxido, (ii) concentração de água, (iii) a concentração de catalisador, (iv) temperatura de reação e v) álcool utilizado (Ostomel et al. 2006).

Para se obter nanopartículas de vidro bioativo com excelente capacidade de dispersão e bioatividade, o processo sol-gel pode ser associado simultaneamente com a técnica ultra-som de alta intensidade. A cavitação ultrasônica (a formação, crescimento colapso de gás cheio de cavidades em um líquido) é responsável pelas propriedades únicas de materiais feitos com ultrassom de alta intensidade. Na presença do ultrassom, as bolhas expandem-se em contato com o campo sonoro. Durante a fase rarefação, espécies voláteis em torno da bolha difundem para dentro da bolha a fim de compensar o aumento do volume e a diminuição da pressão. Reações químicas podem ser conduzidas dentro da bolha, resultando na síntese de materiais nanoestruturados (McNamara et al., 2003).

3.7. Sonoquímica

Sonoquímica é um método de síntese que permite preparar uma grande variedade de materiais, inclusive nanoestruturados, a partir da radiação do ultrassom. As ondas ultrasônicas situam-se no espectro sonoro em frequências maiores do que aquelas que o ouvido humano pode detectar, ou seja, acima de 20KHz (Gedanken, 2004).

Por serem ondas mecânicas as ondas ultrasônicas podem ser transmitidas através de qualquer substância sólida, líquida ou gasosa; onde a fonte de som transmite seu movimento de vibração às moléculas do meio e essas, sucessivamente, transmitem seu movimento às partículas adjacentes antes de voltar à posição média original, gerando assim ciclos de compressão (aproximação das moléculas) e expansão (afastamento das moléculas) (Gedanken, 2004).

Na síntese sonoquímica, as reações químicas e mudanças físicas das partículas não são resultados da interação direta entre as ondas sonoras e o produto em bulk, pois as mesmas possuem comprimento de onda muito maior (0,01 a 10cm) do que as distâncias interplanares que se encontram na faixa de alguns angstroms(Å). As reações químicas que ocorrem durante a irradiação são devidas principalmente ao efeito da cavitação acústica que consiste na formação, crescimento e implosão de bolhas em pontos localizados; aumentando a temperatura no líquido em torno de

5000°C e levando a pressões de cerca de 1000 atm, tendo as bolhas formadas um tempo de vida de alguns microsegundos (Gedanken, 2004).

O estágio que conduz o crescimento das bolhas de cavitação ocorre devido à difusão de vapor do soluto no volume dessas bolhas que foram geradas pelo movimento vibratório das ondas. Após o crescimento, que vai depender do líquido e da frequência das ondas, elas atingem o estágio final, onde então colapsam provocando a quebra das ligações químicas. Esse fenômeno é explicado pela teoria hot spot que ocorre quando a bolha alcança um tamanho de valor crítico, a 20 kHz de frequência, por exemplo, o tamanho da bolha é cerca de 170 micrômetros. Essas condições extremas produzidas podem conduzir a reações químicas como oxidação, redução, dissolução e decomposição, bem como geração de novos produtos (Gedanken, 2004).

Já as mudanças nas características físicas dos materiais dispersos na solução sonicada, são resultantes do choque entre as partículas, promovendo a diminuição dessas, razão pela qual essa técnica vem atraindo grande interesse tecnológico, já que permite a geração de nanopartículas.

Uma das grandes aplicações do ultrassom na área de materiais é na síntese de partículas nanoestruturadas. Numerosos trabalhos vêm sendo publicados mostrando as vantagens da técnica sonoquímica em relação a outros métodos de síntese, como: maior uniformização na distribuição de tamanho de partículas; possibilidade de obtenção de diversas morfologias como nanoesferas, nanobastões, nanodiscos, nanofios entre outras; e principalmente em relação ao tempo de sintetização das amostras. Essas vantagens são resultado das condições únicas alcançadas durante o fenômeno da cavitação acústica gerada durante o processo da sonicação.

4- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR NO TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA

4.1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi sintetizar partículas de vidro bioativo, com o intuito de alcançar a escala nanométrica e avaliar o seu potencial de remineralização *in vitro*.

As partículas de vidro bioativo foram sintetizadas de acordo com a metodologia desenvolvida anteriormente por Oliveira (2013) e caracterizadas por Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para o estudo do potencial de remineralização foram utilizadas amostras de dentina de dentes obtidos do banco de dentes da FO- UFMG, que foram desmineralizadas com ácido fosfórico e tratadas por períodos de 1, 7 e 14 dias com gel contendo VB. Posteriormente, as amostras foram analisadas por MEV, Difração de raios X (DRX) e Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O gel foi caracterizado pelo teste de resazurina para avaliar sua biocompatibilidade.

Os testes foram realizados para avaliar o potencial das partículas de VB em induzir a formação de cristais de hidroxiapatita (HA) e obliterar os túbulos dentinários, para atuar como um material para ser utilizado no tratamento da hipersensibilidade dentinária.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Síntese das partículas de vidro bioativo

Os reagentes usados na síntese das partículas de vidro bioativo foram: tetraetil ortossilicato (TEOS) 98% e trietil fosfato (TEP) (99%) e polietileno glicol *Sigma-Aldrich*, nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), ácido nítrico (HNO_3) e hidróxido de amônio (NH_4OH) 33% *Merck* e metanol *Synth*. Os equipamentos utilizados foram: Ultra-som de alta intensidade (200 Watts e 24 KHz), Estufa de secagem, Liofilizador, Sistema de filtração à vácuo *Milipore* e Mufla para tratamento térmico.

A composição do vidro sintetizado foi: 60%SiO₂ – 36%CaO – 4%P₂O₅. A síntese consistiu em dispersar 5,47mL de TEOS e 0,27 mL de TEP em solução de 10mL de metanol e água (1:2 molar). O pH foi ajustado entre 1-2 por adição de ácido nítrico e a mistura mantida sob agitação magnética até a obtenção de um sol transparente (aproximadamente 10min). O sol é então gotejado em 1200mL de solução de PEG e 0,27mL de hidróxido amônio. O pH da solução é ajustado na faixa de 10-12 e a agitação ultra-sônica é mantida por 1 hora. Após esse período, o sol é colocado em estufa à temperatura de 50°C até a completa evaporação da amônia (aproximadamente 3horas). A mistura é filtrada em *Milipore* 0,22µm e apenas a dispersão passante no filtro é recolhida e submetida à agitação magnética, onde ocorre a dissolução 4,25g de Ca(NO₃)₂.4H₂O por 2 horas. As etapas seguintes são filtrações subseqüentes em *Milipore* 0,22 e 0,11µm e a dispersão passante nos filtros é liofilizada. O pó fino resultante é submetido a um tratamento térmico a 700°C por 40min, com taxa de 1°C/min (Oliveira et al., 2013).

4.2.2. Síntese do gel com partículas de vidro bioativo

Os materiais utilizados para a síntese do gel foram: partículas de vidro bioativo (VB) obtidas conforme descrito na sessão 4.2.1, hidróxi metil celulose (HMC), e solução que simula o fluido corporal (SBF) que foi preparada seguindo a norma ISO/FDIS 23317:2007 (E). Ao SBF foram adicionadas as partículas de VB na concentração de 0,2% (concentração utilizada em soluções de fluoreto de cálcio já comercializadas, indicadas para uso em pacientes com alta atividade de cárie ou hipersensibilidade dentinária) e Hidroximetil celulose (HMC) na concentração de 1,5% (concentração comumente utilizada em formulações farmacêuticas). Esta mistura foi agitada por 10 minutos para atingir uma consistência de gel e tornar-se homogênea.

4.2.3. Preparação dos discos de dentina

O uso de discos de dentina tem sido extensivamente empregado como metodologia de escolha para avaliação do potencial de agentes desensibilizantes na oclusão dos túbulos dentinários por meio de microscopia eletrônica de varredura (Siqueira, 2011).

Foram utilizados neste estudo dentes (molares livres de cáries) obtidos a partir do banco de dentes da FO-UFMG. Os dentes foram seccionados de forma paralela, ligeiramente abaixo da junção esmalte-dentina, mesio - distalmente em discos utilizando brocas diamantadas com refrigeração e embutidos em blocos de resina acrílica. Posteriormente foram submetidos a uma sequência de lixas para obter uma superfície lisa. As amostras foram então colocadas em um frasco contendo água deionizada, e sonicada durante 30 minutos para remover o abrasivo de polimento. Após sonicação, as amostras foram lavadas com água e os discos foram armazenados em hipoclorito de sódio até serem utilizados.

4.2.4. Teste *in vitro* para avaliação da oclusão dos túbulos dentinários

Para realização dos testes, os discos de dentina foram condicionados com ácido fosfórico 37% durante 1 minuto. Após o ataque, as amostras foram lavadas com água deionizada e, em seguida colocada em um frasco de água deionizada, e sonicado por 30 minutos. Posteriormente cada amostra foi inserida em um tubo falcon com 20ml de gel com partículas de VB (0,2%) e mantidas em banho maria a 37°C. Este experimento foi realizado em triplicata para cada um dos tempos (1,7,14 dias). Foi realizado também um teste com grupo controle utilizando o mesmo gel, porém sem partículas de VB. Posteriormente os discos foram lavados novamente com água destilada, colocados no sonicador por 30 minutos e mantidos na estufa a 40°C por 24hs para secagem.

4.2.5. Caracterização do gel

Foi realizado o teste de citotoxicidade com resazurina para avaliar a biocompatibilidade do gel com partículas de vidro bioativo. O teste foi realizado com fibroblastos e seguiu as normas da ISO 10993 (Parte 5 – Testes de citotoxicidade *in vitro*).

Ensaio de toxicidade por resazurina: Fibroblastos gengivais humanos da sétima passagem foram plaqueados (1×10^3 células/poço) em placa de 96 poços. As populações celulares foram normalizadas com meio sem soro durante 24 horas, depois desse período o meio foi aspirado e meio com 10% de SFB foi recolocado. Para a realização deste teste, o gel com 0,2% de partículas de VB foi diluído no meio

de cultura nas concentrações 3%, 5% e 10%. Foram utilizados como controle de referência DMEM com 10% de SFB, como controle positivo PBS (10X) e como controle negativo lascas de 'ependorf'. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3). Após 72 horas todo meio foi aspirado e 180µL de meio de cultura e 20µL de resazurina (0.1mg/mL; SIGMA-ALDRICH, USA) foram colocados em cada poço e incubados por 18 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Depois foram retirados 100µL de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com filtro duplo de 570nm e 590nm.

4.2.6. Caracterização dos discos de dentina

Os discos de dentina foram caracterizados utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios-X (EDS), Difração de raios-X (DRX) e Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

As amostras de dentina foram examinadas por MEV antes e após o tratamento com o gel com VB. Antes do tratamento, os discos de dentina foram examinados por MEV para assegurar que os túbulos da dentina estavam abertos. As amostras foram examinadas após o tratamento para determinar o efeito do gel com VB.

Após a avaliação da oclusão dos túbulos por MEV, as amostras foram analisadas por EDS para análise qualitativa da composição elementar do material que ocluiu os túbulos. Esta análise foi realizada sobre a área ocluída. A análise de DRX foi realizada para caracterização estrutural da amostra e a técnica de FTIR para caracterizar os grupos funcionais presentes nas amostras em estudo.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Partículas de vidro bioativo

A figura 6 apresenta a microfotografia de MEV das partículas de vidro bioativo sintetizadas neste trabalho. Pode-se observar regiões com partículas aglomeradas,

em que não se consegue distinguir claramente tamanho e forma, apresentando partículas possivelmente nanométricas, o que não pode ser definido devido à limitação do equipamento. Observa-se também regiões em que se visualiza o formato esférico de partículas maiores. A forma esférica é muito importante já que poderá acarretar uma diminuição ou até mesmo a eliminação das irritações que são causadas quando utilizado o biovidro na forma particulada (Tirapelli *et al.*, 2010). Não foram realizadas outras técnicas de análise das partículas, pois esta parte do estudo foi apenas preliminar com o intuito de avaliar o potencial de obliteração dos túbulos dentinários para o tratamento da HD.

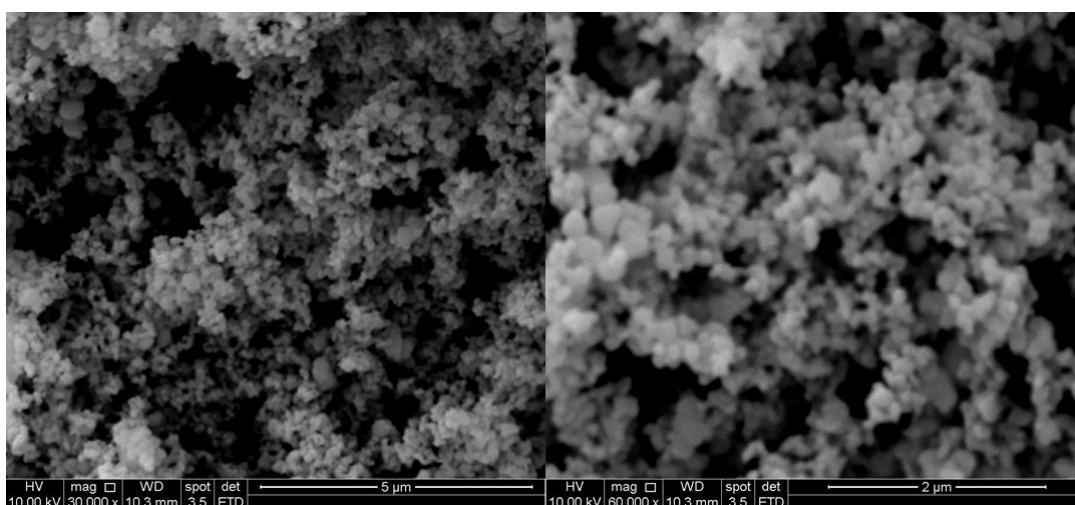


Figura 6. Imagem de MEV das partículas de vidro bioativo

4.3.2. Caracterização do Gel com partículas de VB – ensaio de resazurina

A atividade mitocondrial foi quantificada pelo ensaio de resazurina. Esse ensaio é específico para avaliar a viabilidade celular através da função mitocondrial. Fibroblastos gengivais foram incubados com gel de partículas de vidro por 72 horas e sua viabilidade foi avaliada em comparação com as condições controle. Fibroblastos demonstraram um aumento de 42%, 56% e 43% na viabilidade celular quando em contato com as diluições de 3%, 5% e 10% do gel contendo 0,2% de VB respectivamente, conforme apresentado na figura 7. Experimentos foram realizados com n=3 (p<0.05) análise estatística: One way / ANOVA / Bonferroni / GraphPad Prism). Esses resultados demonstraram que o gel com 0,2% de VB não é tóxico para células da cavidade oral, podendo ser utilizado como constituinte de cremes dentais

de uso diário. Também é possível sugerir que este material estimulou a atividade celular confirmando o seu potencial bioativo.

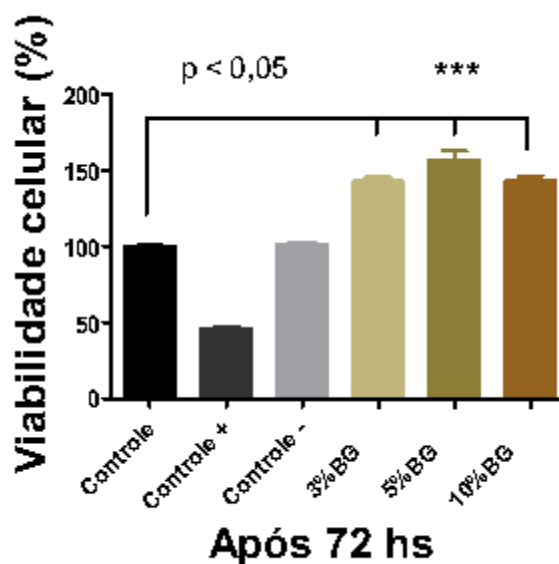


Figura 7. Viabilidade celular. Demonstra um aumento de $142 \pm 5\%$, $156.7 \pm 11\%$ e $143 \pm 5\%$ na viabilidade dos fibroblastos gengivais quando em contato com 3%, 5% e 10% de gel de vidro bioativo respectivamente em comparação com o grupo controle ($p < 0.05$, $n=3$).

4.3.3. Caracterização dos discos de dentina

4.3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura

A análise morfológica das amostras pela MEV, após o ataque ácido dos discos de dentina, permitiu constatar que túbulos dentinários estavam abertos como observado na figura 8.

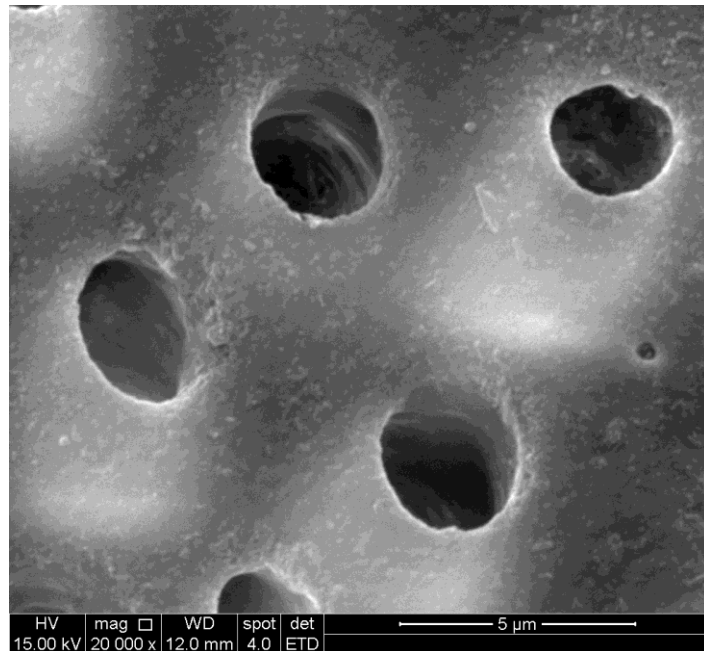


Figura 8. MEV discos de dentina antes do tratamento com gel com partículas de VB – túbulos abertos

As figuras 9, 10 e 11 apresentam os resultados do estudo após 1, 7, e 14 dias respectivamente, de tratamento com gel contendo 0,2% de VB. É possível observar que os túbulos dentinários das amostras de dentina foram parcialmente ocluídos no intervalo de 14 dias sem que fosse necessária escovação ou força mecânica, conforme apresentado na figura 11. Em contraste, nenhuma oclusão dos túbulos dentinários foi observada na amostra controle, utilizando gel sem VB, apresentado na figura 12.

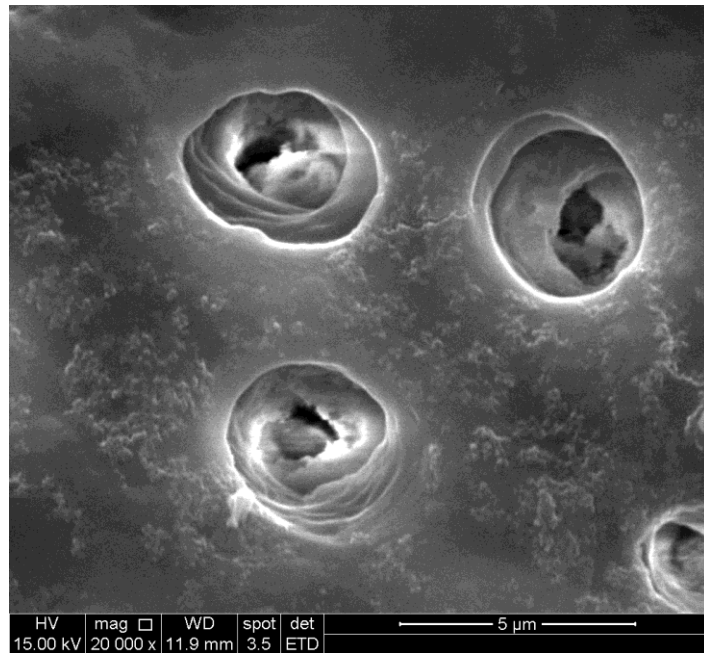


Figura 9. MEV discos de dentina após 1 dia de tratamento com gel com VB

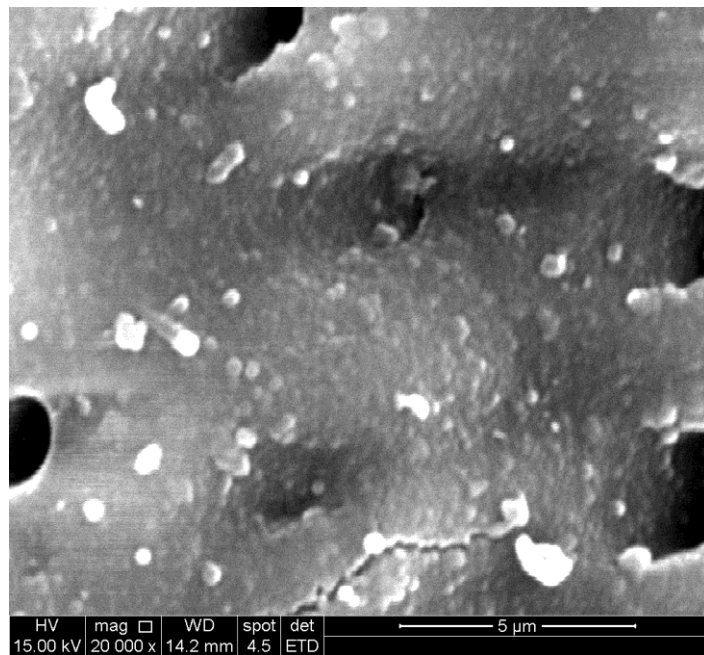


Figura 10. MEV discos de dentina após 7 dias de tratamento com gel com VB

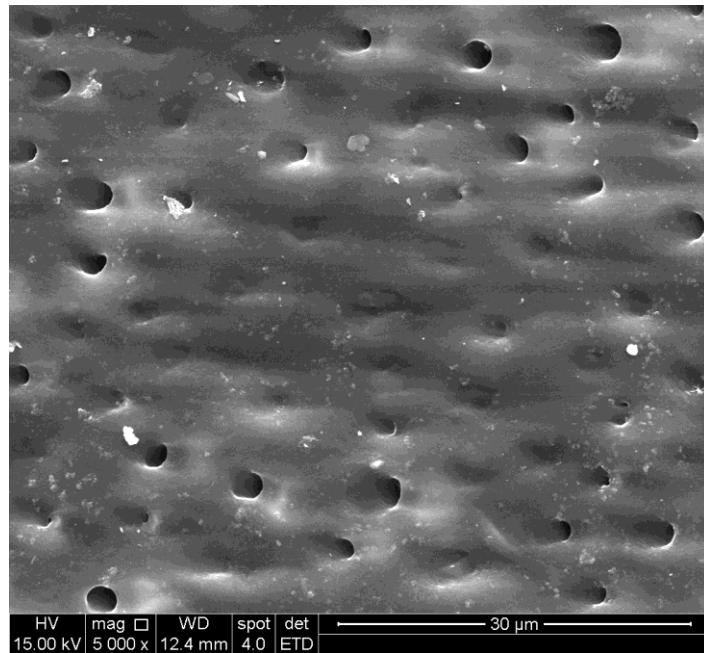


Figura 11. MEV discos de dentina após 14 dias de tratamento com gel com VB

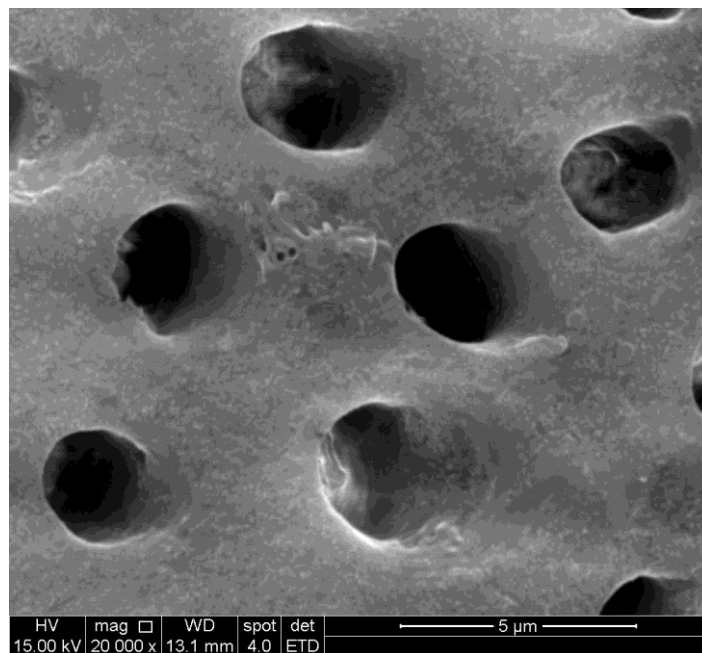


Figura 12. MEV discos de dentina após 14 dias de tratamento com gel sem VB

Este resultado demonstra o potencial das partículas de VB de serem utilizadas no tratamento da hipersensibilidade. É possível considerar, levando em conta as imagens de MEV obtidas, e as características estruturais de materiais similares obtidos pelo processo sol-gel relatados por outros autores (Oliveira *et al.*, 2013, 2014), que as partículas do vidro bioativo sintetizado neste trabalho apresentam tamanho de partícula reduzido e maior área de contato, quando comparado a sistemas obtidos por

fusão e moagem. Este aspecto pode ser responsável por otimizar a possibilidade de deposição dos cristais de hidroxiapatita e até mesmo das próprias partículas de VB no interior dos túbulos. Estes resultados diferem dos encontrados no estudo de Brauer (2010), no qual, o vidro bioativo sem flúor, obtido pela rota de fusão, não formou apatita, enquanto os vidros bioativos que continham flúor formaram apatita. Foi relatado que este resultado poderia indicar que a incorporação do flúor aumentaria a taxa de degradação do vidro e/ou o fluoreto promoveria a formação de apatita, provavelmente a fluorapatita (FAP), seu produto de menor solubilidade, em vez da hidroxiapatita carbonatada (HAC). Sendo assim, neste estudo foi observado que é possível formar uma fase, possivelmente a apatita, para a obliteração dos túbulos dentinários a partir de vidros bioativos sem flúor sintetizados pela rota sol-gel. É possível presumir que a escala nanométrica e a síntese pela rota sol – gel são parâmetros que aumentam a bioatividade e a taxa de degradação dos vidros bioativos (Langer *et al.*, 2000).

4.3.3.2. Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios-X

A avaliação qualitativa da amostra realizada por EDS, realizada no interior dos túbulos dentinários ocluídos, representada na figura 13, mostrou que o material encontrado no interior dos túbulos dentinários apresentou os picos de Ca, P e O em concentrações significativas. O pico do carbono está relacionado à técnica de preparação das amostras. A presença do Ca, P e O, indica que houve deposição de fosfato de cálcio (FC) no interior dos túbulos dentinários.

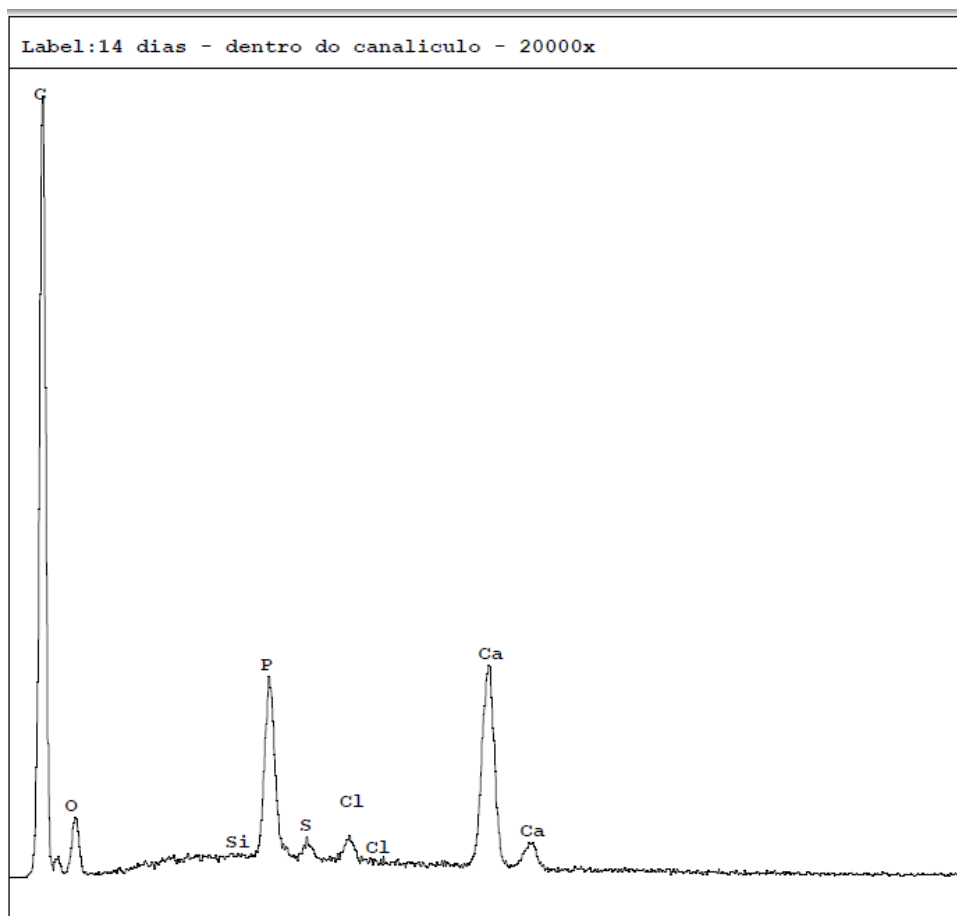
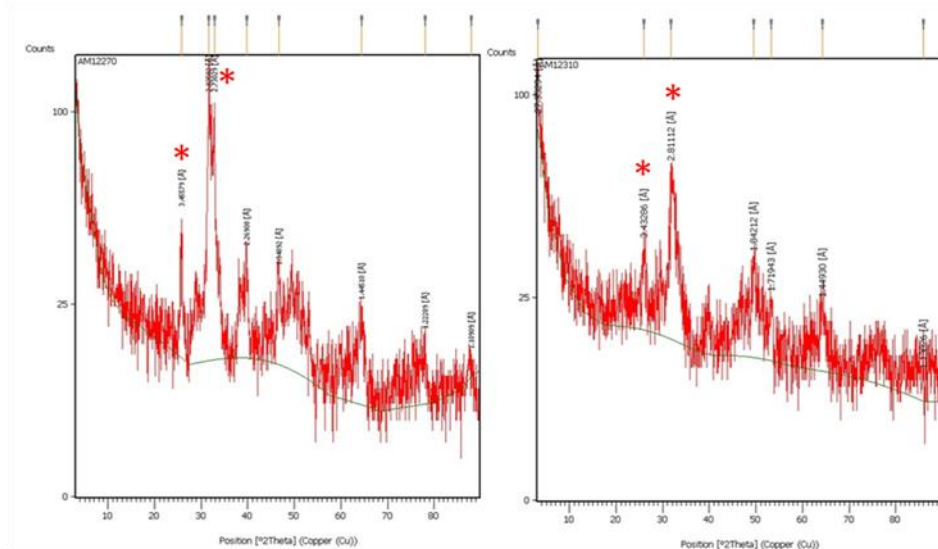


Figura 13. Espectro de EDS realizado no interior dos túbulos dentinários após 14 dias de tratamento com gel com VB

4.3.3.3. Difração de raios-X

Os espectros de DRX das amostras de discos de dentina antes e após tratamento com o gel contendo VB, representados na figura 14, apresentaram perfis semelhantes. Os espectros apresentaram os principais picos da hidroxiapatita, em 2,82 e 3,45 graus (Costa *et al.*, 2009), contudo, não é possível definir se ocorreu a precipitação da HA após o tratamento com o gel com VB, devido ao fato da HA ser um constituinte natural da estrutura dental e ao principal mecanismo de ação dos vidros bioativos ser justamente a liberação de cálcio e fosfato para resultar em supersaturação dos fluidos ao redor e, posteriormente, precipitação de cristais de HA, contribuindo para aumentar os processos de remineralização dentro da cavidade oral (Hench *et al.*, 1989; Ahamed *et al.*, 2014). Entretanto, como a formação de uma fase de FC no interior dos túbulos

foi confirmada por EDS, e a análise de DRX somente indicou a presença da fase HA, podemos supor que esta é a fase formada, e que leva a obliteração dos túbulos.



* Picos principais da HA

Figura 14. Difratoograma de RX das amostras antes e depois (respectivamente) do tratamento por 14 dias com gel com VB

4.3.3.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

O espectro de FTIR representado na figura 15, dos discos de dentina antes e após o tratamento com o gel contendo VB também se apresenta semelhante ao da HA. Observa-se as bandas dos íons fosfato (PO_4^{3-}), em $1087,7 \text{ cm}^{-1}$ associados aos modos de vibração de estiramento assimétrico em P-O; a banda em $995,1 \text{ cm}^{-1}$ é vinculada ao modo de vibração ν_1 de estiramento simétrico em P-O. Observa-se no espectro uma pequena banda em 875 cm^{-1} que pode ser atribuída a grupos carbonato ou como também grupos dos fosfatos hidrogenados (HPO_4^{2-}). Na região de $3012 \text{ a } 3686 \text{ cm}^{-1}$ observa-se a banda dos íons hidroxil (OH^-) associada ao modo de vibração ν_1 de estiramento simétrico e também ao OH estrutural. Além desta banda larga as moléculas de água produzem um espectro vibracional em 1633 cm^{-1} que é típico de um modo de vibração ν_2 com deformação simétrica em torno do O-H-O (Costa *et al.*, 2009). As bandas das ligações relativas ao vidro bioativo não foram identificadas

devido à baixa concentração utilizada ou devido ao fato de provavelmente já ter ocorrido a sua dissolução.

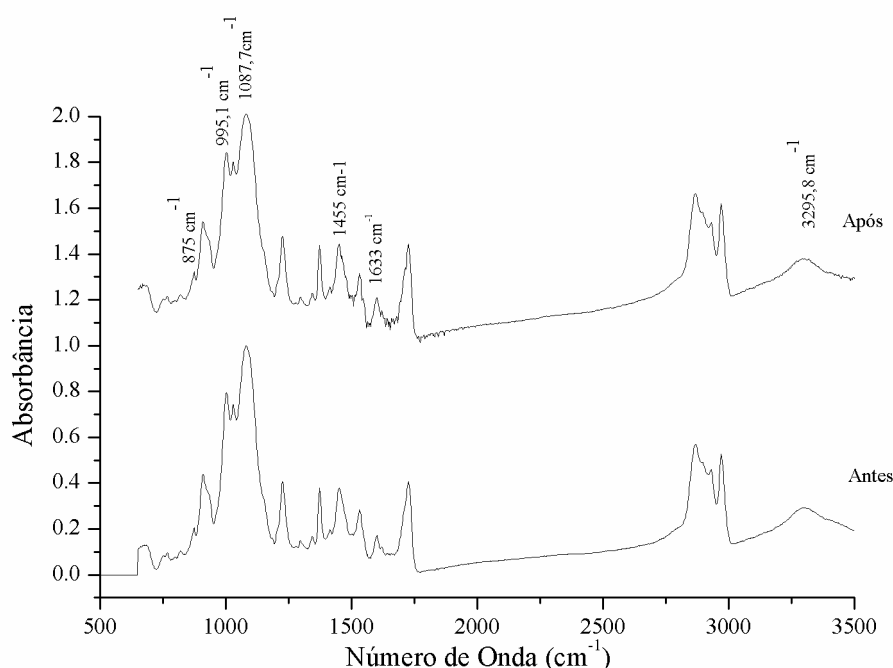


Figura 15. Espectro de FTIR das amostras antes e após tratamento com gel com VB

4.4. CONCLUSÕES

Nesse estudo foi avaliada a utilização do gel contendo partículas de vidro bioativo para a obstrução dos túbulos dentinários. Foi verificado um aumento da viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos na presença do gel contendo 0,2% de VB, o que indica que o gel não é tóxico para células da cavidade oral. Os resultados das análises que avaliaram os discos de dentina demonstraram que o gel contendo VB induziu a deposição de cristais de apatita, obliterando parcialmente os túbulos dentinários abertos. Portanto, podemos sugerir que o gel contendo VB avaliado neste estudo pode ser incorporado como constituinte de cremes dentais e exaguatorios bucais, apresentando grande potencial para ser utilizado no tratamento da HD.

5- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO FLÚOR E AVALIAÇÃO *IN VITRO* PARA TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA

5.1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar micropartículas de vidro bioativo contendo flúor (MPVBF) e avaliar o potencial de remineralização *in vitro* a fim de se avaliar o efeito da composição do vidro e possivelmente aumentar a eficácia do tratamento da HD. MPVBF foram preparadas pela rota sol-gel, e caracterizadas pelas técnicas de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDS), Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Adsorção de N₂.

Para o estudo *in vitro* do potencial de remineralização foram utilizadas amostras de dentina de dentes obtidos do banco de dentes da FO-UFGM, que foram desmineralizadas com ácido fosfórico e tratadas por períodos de 1, 7 e 14 dias com gel contendo MPVBF. Posteriormente, as amostras foram analisadas por MEV.

Os testes foram realizados para avaliar o potencial das MPVBF em induzir a formação de cristais de HA e/ou FAP e obliterar os túbulos dentinários, para atuar como um material para ser utilizado no tratamento da HD.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Síntese das micropartículas de vidro bioativo contendo flúor

A síntese do vidro bioativo microparticulado seguiu o método sol-gel, rota alcóxido, conforme representado na figura 16. Trietil fosfato (TEP) (99%) e tetraetil orthosilicato (TEOS) 98% foram hidrolisados em solução de água e ácido nítrico por 1 hora. O nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂.4H₂O) foi adicionado à mistura e solubilizado por 1 hora. O sol resultante foi colocado em recipientes de Teflon mantidos em estufa para a gelificação, envelhecimento (a 60°C por 72 horas) e secagem (até a temperatura de 120°C). O sólido obtido foi triturado, peneirado e separado na faixa menor que 38µm, e submetido a um tratamento térmico de 700°C por 180 minutos.

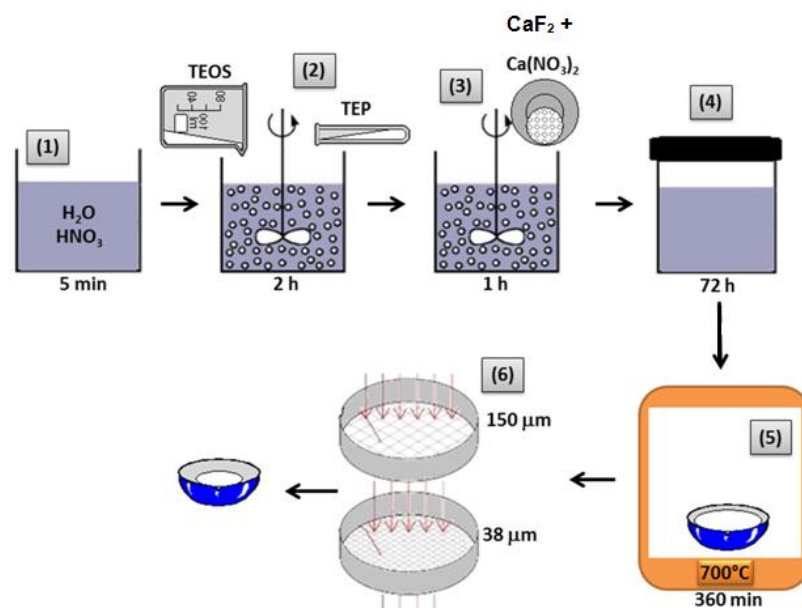


Figura 16. Representação esquemática da síntese das micropartículas de vidro bioativo contendo flúor

Para a produção de micropartículas contendo flúor o reagente fluoreto de cálcio (CaF_2) foi adicionado durante a síntese, substituindo parte do reagente nitrato de cálcio usado na síntese sem flúor na proporção CaO-X , onde X é a massa de CaF_2 adicionada. As micropartículas foram preparadas variando as concentrações de CaF_2 em 0, 9, 27 e 36% em massa, conforme tabela 1. Sendo assim, foram sintetizadas as MPVBF com variações em sua composição de flúor: 0%, 9%, 27% e 36%. O objetivo dessas variações foi definir qual composição apresenta melhores características para a aplicação desejada.

Tabela 1. Variação na composição nominal das MPVB contendo flúor

Amostra	SiO_2	CaO	P_2O_5	CaF_2
MPVB	60%	36%	4%	-
MPVB 9%F	60%	27%	4%	9%
MPVB 27%F	60%	9%	4%	27%
MPVB 36%F	60%	-	4%	36%

Após análise dos resultados obtidos para este tipo de micropartículas, os quais serão descritos ao longo deste trabalho, foi proposta a síntese das MPVB 9%F utilizando o ultrassom. As sequencias seguidas para as sínteses foram similares ao descrito anteriormente, as diferenças ocorreram apenas nas etapas de mistura dos reagentes,

que foram realizadas com a utilização do ultrassom de alta intensidade por 30 minutos. Sendo assim, neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para as MPVBF sintetizadas sem uso de ultrassom que foram denominadas neste trabalho como Micro A, e resultados das MPVBF sintetizadas com ultrassom, que foram denominadas Micro B.

5.2.2. Caracterização das Micropartículas de vidro bioativo contendo flúor

MPVBF foram caracterizadas pelas técnicas de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios-X (EDS), Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Adsorção de N₂.

A morfologia da MPVBF foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando o equipamento Tecnai G220 FEI, equipado com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), para avaliar qualitativamente a composição química da amostra.

A análise de Difração de Raios X (DRX) foi realizada para se obter características sobre a estrutura das MPVBF. Os espectros foram coletados no equipamento Philips PW1700 utilizando radiação Cu-Ka ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) a 40kV/40mA.

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para caracterizar os grupos funcionais presentes nas amostras em estudo. Foi utilizado o equipamento Nicolet 6700, da Thermo Scientific para realização das análises. Os espectros foram coletados pela técnica ATR na faixa do infravermelho médio, foram feitas 64 varreduras entre 650 e 4000cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹ e intervalos de 2cm⁻¹ e as curvas foram normalizadas.

As isotermas de adsorção-dessorção de N₂ foram medidas a 77K em um Quantachrome9. A área de superfície específica foi determinada com o Brunauer-Emmett-Teller (BET), método que utiliza os pontos dos dados de adsorção na pressão relativa (P/Po) na faixa de 0,01-0,30. A distribuição do diâmetro dos poros foi calculada pelo método BJH aplicada às curvas de dessorção. A dessorção é preferível à adsorção por estes cálculos, porque geralmente ocorre com menor pressão relativa, o que é considerado como sendo uma melhor aproximação do equilíbrio

termodinâmico. Os tipos de isotermas foram avaliados de acordo com a sua forma e tipo de histerese entre os modos de adsorção-dessorção (Webb, 1997).

5.2.3. Síntese do gel contendo micropartículas de vidro bioativo com flúor

Os materiais utilizados para a síntese do gel foram: MPVBF, hidróxi metil celulose (HMC), e solução que simula o fluido corporal (SBF) que foi preparada seguindo a norma ISO/FDIS 23317:2007 (E) (Método para a detecção da formação de apatita formada sobre uma superfície de um material em fluido corporal simulado). Ao SBF foram adicionadas as MPVBF na concentração de 1% (segundo a concentração que Tirapeli (2012) utilizou para gel contendo Biosilicato®) e a HMC na concentração de 1,5% (concentração comumente utilizada em preparações farmacêuticas). Esta mistura foi agitada por 10 minutos para atingir uma consistência de gel e tornar-se homogênea.

5.2.4. Preparação dos discos de dentina

Foram utilizados neste estudo dentes (molares livres de cáries) obtidos a partir do banco de dentes da FO-UFMG. Os dentes foram seccionados de forma paralela, ligeiramente abaixo da junção esmalte-dentina, mesio - distalmente em discos utilizando brocas diamantadas com refrigeração e posteriormente embutidos em blocos de resina acrílica. Posteriormente foram submetidos a uma sequência de lixas para obter uma superfície lisa. As amostras foram então colocadas em um frasco contendo água deionizada, e sonicada durante 30 minutos para remover o abrasivo de polimento. Após sonicação, as amostras foram lavadas com água e os discos foram armazenados em hipoclorito de sódio até serem utilizados.

5.2.5. Teste *in vitro* para avaliação da oclusão dos túbulos dentinários

Para realização dos testes, os discos de dentina foram condicionados com ácido fosfórico 37% durante 1 minuto. Após o ataque, as amostras foram lavadas com água deionizada e, em seguida colocada em um frasco de água deionizada e sonicado por 30 minutos. Posteriormente, cada amostra foi inserida em um tubo falcon com 20ml de

gel com micropartículas (1%) e mantida em banho a 37°C. Este experimento foi realizado em triplicata para cada um dos tempos de 1,7, 14 dias. Foi realizado também um teste com grupo controle utilizando o mesmo gel, porém sem micropartículas. Posteriormente foram lavados novamente com água destilada, colocados no sonicador por 30 minutos e mantidos na estufa 40°C por 24hs para secagem. As amostras de dentina foram examinadas por MEV antes e após o tratamento com o gel.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Caracterização das Micropartículas de vidro bioativo contendo flúor

5.3.1.1. Microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia por dispersão de energia de raio X

A Figura 17(A) apresenta a imagem de MEV das MPVBF produzidas com 9% de flúor sem ultrassom (Micro A). A distribuição de tamanho das partículas está na faixa menor que 38µm. As amostras com 27% e 36% de flúor apresentaram resultados semelhantes. Foi observado também que a amostra apresentava-se heterogênea, com algumas partículas mais lisas e outras mais rugosas.

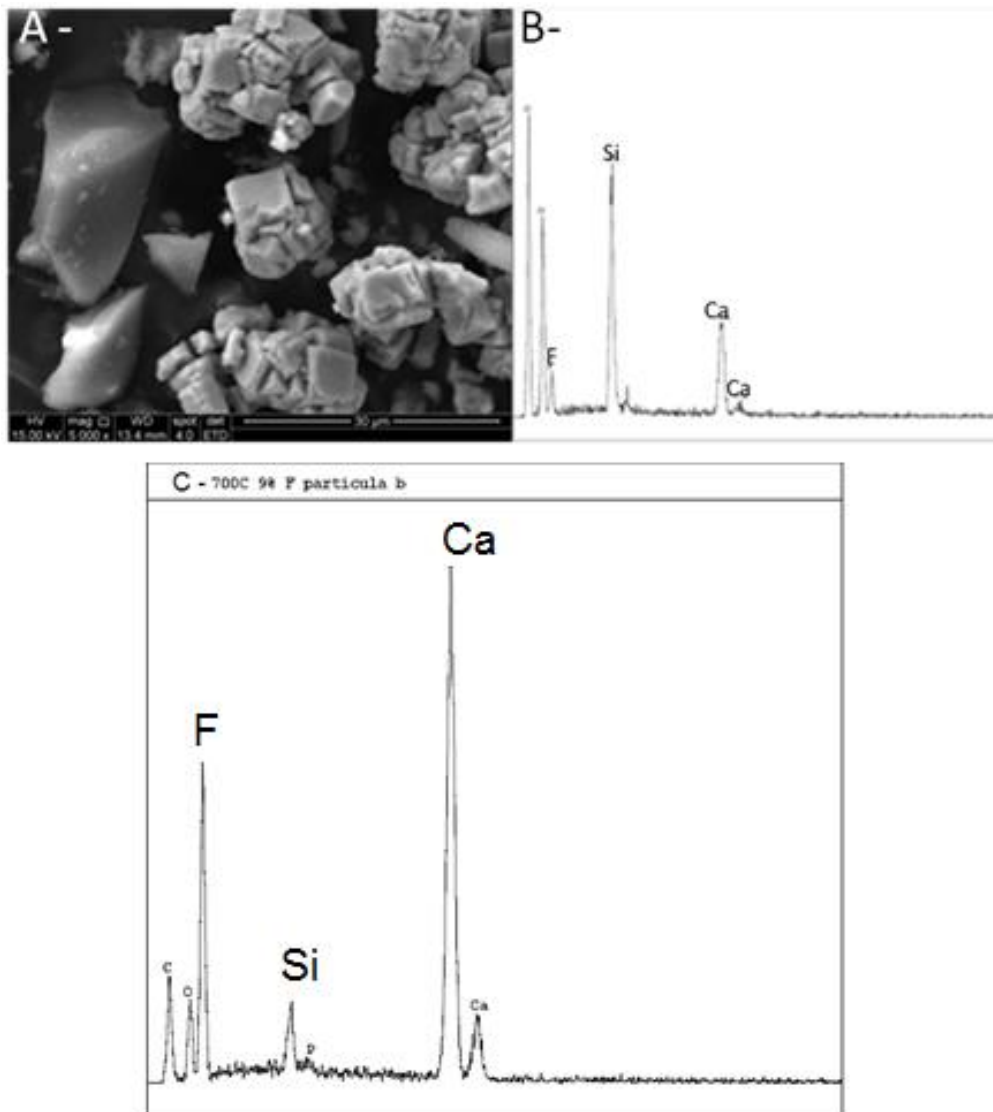


Figura 17. (A) Imagem MEV, (B) Espectro geral de EDS, (C) Espectro de EDS das partículas rugosas, para as FVBMP 9% sintetizadas sem utilização de ultrassom.

A análise de EDS representada na figura 17(B) mostrou a presença de Ca, Si, P e F na avaliação geral da composição. Contudo na análise de EDS da avaliação pontual das partículas, as mais rugosas eram compostas de mais flúor e cálcio, e menos Si e P, representado na figura 17(C), e as mais lisas não apresentavam F. Como a análise de MEV da amostra com 0% de flúor mostrou que esta era mais homogênea, apresentando a fase mais lisa, pode-se supor que pode ter havido uma separação de fases, e devido ao predomínio de Ca e F na fase com morfologia mais rugosa, sugere-se que possa ter ocorrido a reprecipitação de parte do CaF_2 durante a síntese.

Macroscopicamente também foi possível observar a presença de duas fases distintas, uma fase branca opaca e outra de cristais translúcidos, conforme figura 18.



Figura 18. Imagem macroscópica da amostra Micro A

A utilização do ultrassom de acordo com Gedanken (2004) acarreta uma maior reatividade química devido ao fenômeno da cavitação acústica gerada durante o processo da sonicação, sendo assim, com a finalidade de se obter um material mais homogêneo, foi proposta a síntese das MPVBF contendo 9% de flúor com ultrassom (US) (Micro B).

A figura 19(A) apresenta a imagem de MEV das MPVBF produzidas com 9% de flúor com utilização de ultrassom (Micro B). Foi possível observar que esta amostra apresentava-se mais homogênea que as amostras produzidas sem US. A análise de EDS (Fig. 19 (B)) mostrou a presença de Ca, P, Si e F na avaliação da composição das partículas. Macroscopicamente as amostras apresentavam-se como um material homogêneo, conforme representado na figura 20.

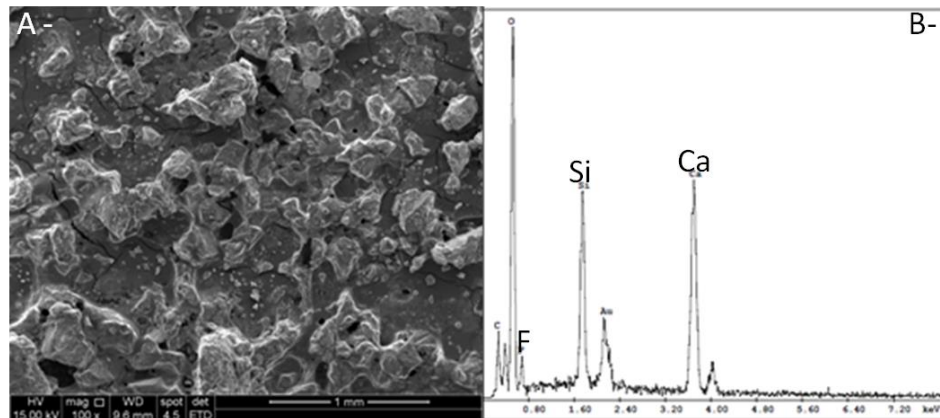


Figura 19. (A) Imagem MEV e (B) Espectro de EDS das FVBMP 9% com ultrassom



Figura 20. Imagem macroscópica da amostra Micro B

5.3.1.2. Difração de Raio X

O espectro de DRX das MPVBF (Micro A) com 9%, 27% e 36% de flúor, representado na figura 21, apresentou uma aumento da fase cristalina com o aumento da concentração de flúor na amostra e um perfil semelhante ao difratograma padrão do CaF_2 .

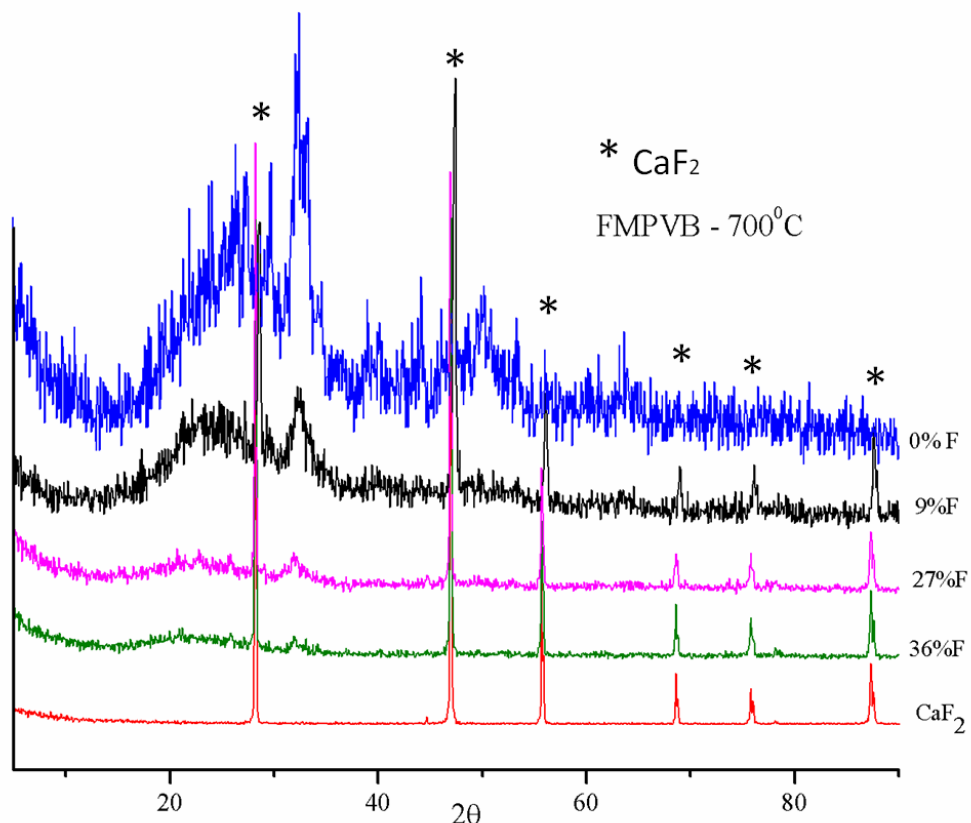


Figura 21. Espectro de DRX das MPVBF (Micro A) com 0%F, 9%F, 27%F, 36% de flúor e do CaF₂

Comparando o espectro de DRX da amostra das micropartículas sem flúor com as micropartículas contendo flúor nas diferentes concentrações, é possível observar que houve uma redução na fase amorfa e um aumento da cristalinidade nas amostras contendo flúor.

As análises de MEV, EDS e DRX sugerem que ocorreu reprecipitação do CaF₂ na amostra Micro A. A partir desses resultados foi proposta a síntese das MPVBF utilizando o ultrassom (Micro B), selecionando somente a concentração de 9% de flúor, que apresentou um perfil intermediário com banda amorfa e picos cristalinos, e também para ser possível comparar os resultados com os obtidos por Brauer (2010, 2011, 2012) e Lynch (2011) que utilizaram esta concentração de flúor para síntese de micropartículas de vidro bioativo contendo flúor pela rota de fusão.

A temperatura de tratamento térmico foi selecionada levando em consideração o espectro de DRX apresentado na figura 22, que apresenta as MPVBF 9% sem tratamento térmico, e após tratamento térmico à 200°C, 400°C, 700°C e 900°C. As temperaturas mais baixas, 200°C e 400°C, não foram selecionadas na tentativa de garantir que o cálcio e o flúor fossem incorporados a rede do vidro. Os espectros após o tratamento térmico à 700°C e 900°C foram similares, contudo o aumento da temperatura de tratamento térmico acarreta um aumento da cristalinidade, que é uma característica que pode alterar consideravelmente a bioatividade e a taxa de degradação das micropartículas produzidas. Portanto, a temperatura de tratamento térmico selecionada para a amostra Micro B foi a de 700°C.

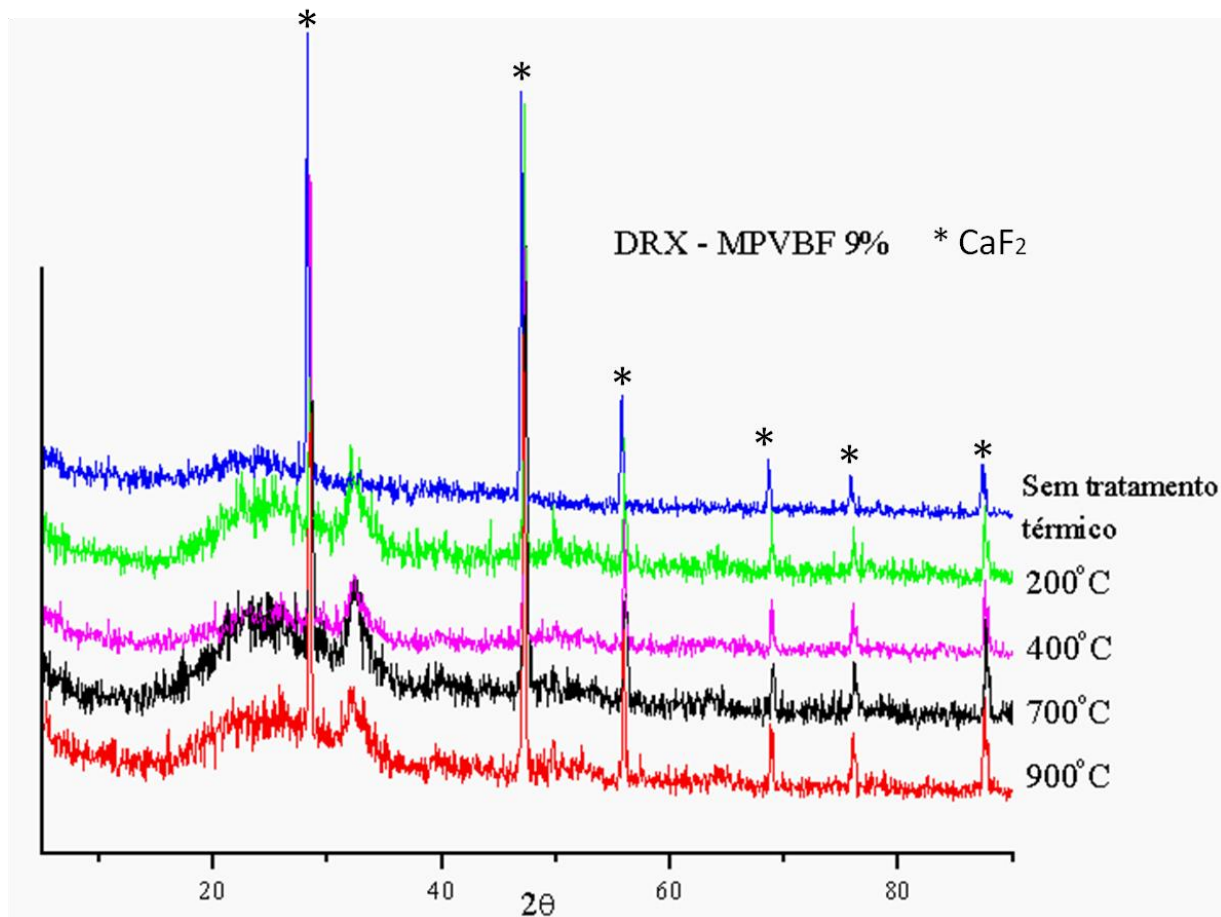


Figura 22. Espectro de DRX da amostra Micro A 9%F sem tratamento térmico e após tratamento térmico à 200°C, 400 °C, 700°C e 900 °C

A análise do espectro de DRX, representada na figura 23, mostra que ocorreu a presença dos picos referentes ao CaF_2 também para a amostra Micro B, contudo a

banda amorfa apresenta-se de forma mais acentuada. Pode-se supor então que o uso de ultrassom durante a síntese não evita a formação da fase CaF_2 , mas possivelmente pode afetar sua distribuição no material.

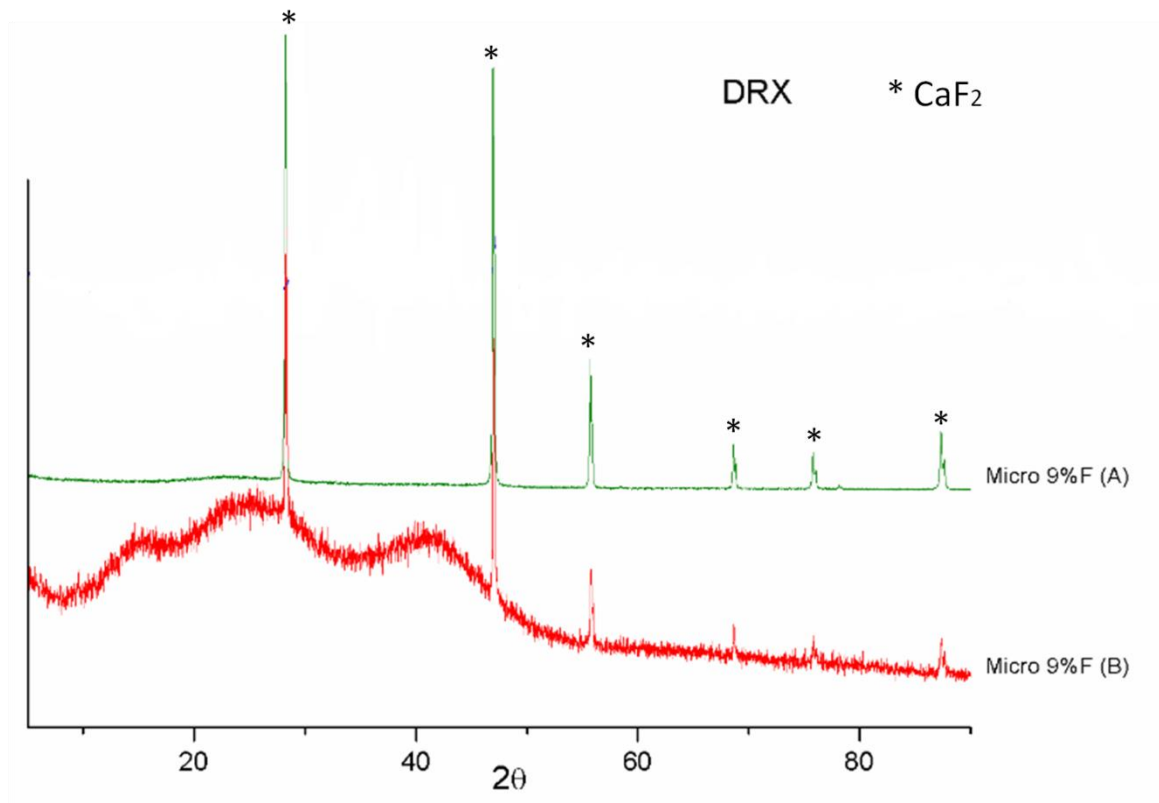


Figura 23. Espectro de DRX das amostras Micro A e Micro B tratadas a 700°C

5.3.1.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Avaliando o espectro de FTIR representado na figura 24 das MPVBF com 0%, 9%, 27% e 36% (Micro A) de flúor, é possível observar a banda entre 3800 e 3000 cm^{-1} em todos os espectros e corresponde às vibrações de estiramento de diversos grupos hidroxil. Essa banda é composta pela superposição das vibrações de estiramento das ligações SiO-H em: 3750 cm^{-1} , estiramento isolado de SiO-H vicinal; 3660 cm^{-1} , estiramento do H ligado e/ou estiramento interno das ligações SiO-H ; 3450 cm^{-1} , estiramento SiO-H dos grupos silanol superficiais que fazem ligação de hidrogênio com as moléculas de água; $3430\text{-}3420\text{ cm}^{-1}$. As bandas em 1200 e 1090 cm^{-1} são associadas aos modos vibracionais LO e TO, respectivamente, de estiramento

assimétrico das ligações Si–O–Si em várias espécies cíclicas, com 4 a 8 átomos de Si e na rede. Em 964 cm^{-1} , associa-se ao modo vibracional das ligações Si–OH, formadas, em sua maioria, pela presença de íons Ca^{2+} . A banda na faixa de 830 a 760 cm^{-1} é resultado da sobreposição das bandas em 806 cm^{-1} , relacionada ao estiramento simétrico Si–O–Si e aos modos vibracionais dos anéis (Padilla *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007).

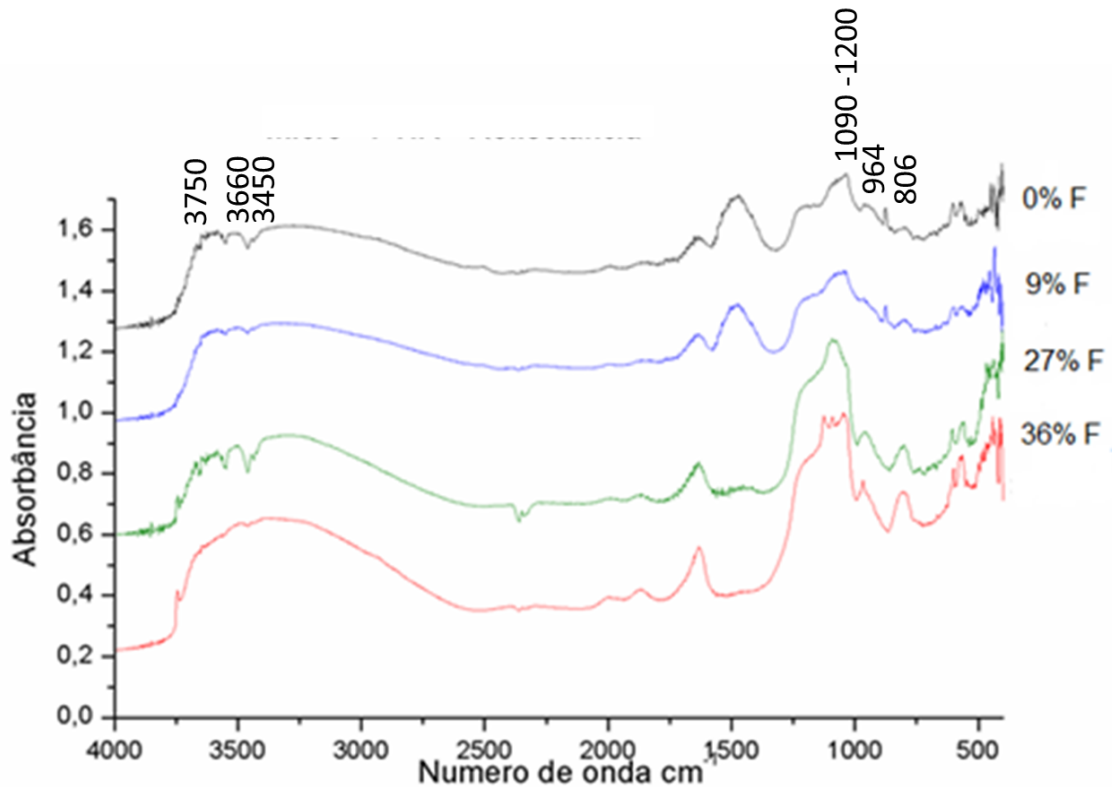


Figura 24. Espectro de FTIR das MPVBF (Micro A) com 0%, 9%, 27% e 36% de flúor

No caso das MPVBF pode-se observar o aumento relativo das intensidades das duas bandas próximas de fosfatos 570 cm^{-1} e 610 cm^{-1} , em relação à banda de deformação da sílica no 470 cm^{-1} , que ocorre devido a presença do flúor (Lusvardi *et al.*, 2009), e está mais evidenciada na amostra com 36% de flúor. Isto sugere que o flúor foi, em parte, provavelmente incorporado a micropartícula ou ao sistema.

5.3.1.4. Adsorção de N₂

A Figura 21 mostra as isotermas de adsorção/dessorção de N₂ e análise BJH da distribuição do tamanho de poros. As isotermas podem ser identificadas como tipo IV, que é característica de materiais mesoporosos (material poroso cujos poros têm diâmetro de 2 a 50nm). Mesoporosidade é caracterizada pela presença de histerese de adsorção e dessorção. Os ciclos de histerese do tipo H2 são caracterizadas pela adsorção estreita e íngreme e paralela a dessorção, e que correspondem aos poros que apresentam forma alongada.

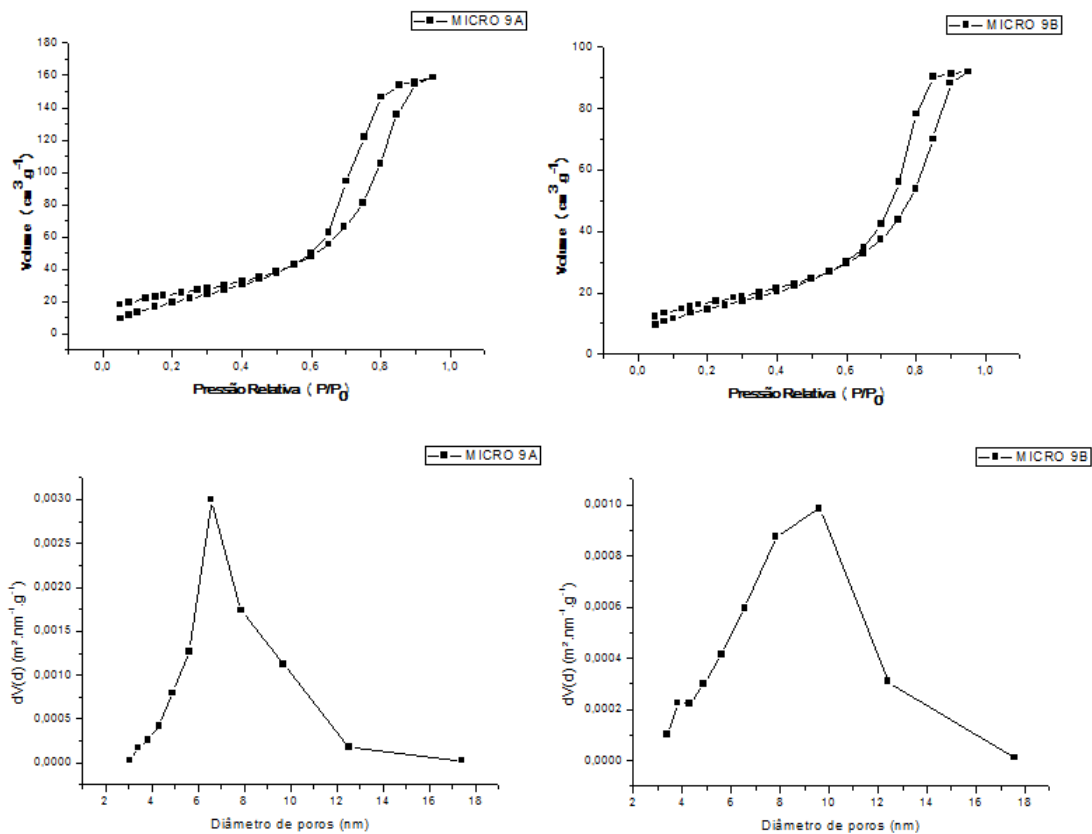


Figura 21. Isotermas de adsorção/dessorção de N₂ e análise BJH das amostras Micro A e Micro B

A análise BET e das curvas de adsorção mostraram que as MPVBF contendo 9% de flúor sem ultrassom (Micro A) e com ultrassom (Micro B) apresentaram uma área superficial de 151,9m²/g e 73,1m²/g, e volume de poros de 0,274cc/g e 0,148 cc/g respectivamente, conforme tabela 2.

Tabela 2. Valores das áreas de superfície e volumes de poro das amostras Micro A e Micro B

	Micro 9% A (sem ultrassom)	Micro 9% B (com ultrassom)
Área superfície	151,9 m ² /g	73,1 m ² /g
Volume de poro	0,274 cc/g	0,148 cc/g

A amostra Micro B pode ser chamada de sonogel, que é um material obtido a partir da combinação do método sol-gel com a cavitação ultrasônica, que fornece um ambiente exclusivo para reações de sol-gel, o que permite a formação de particularidades no gel resultante: alta densidade, textura fina, estrutura homogênea, entre outras características. Essas propriedades determinam a evolução do sonogel na transformação da estrutura do material final. Os géis convencionais apresentam uma maior porosidade, porém os materiais sonogéis apresentam vantagens como: obtenção de partículas menores, facilidade de síntese (menor tempo e facilidade de obtenção de esferas), mais denso, área superficial menor, superfície mais lisa, reações de superfície diferentes, ser mais homogêneo (maior uniformização na distribuição de tamanho de partículas e na composição) (Verma *et al.*, 2012). Esta uniformização da composição devido a utilização do US na amostra Micro B foi observada no MEV e macroscopicamente, como foi relatado e apresentado na figuras 16 e 17.

As partículas Micro B obtidas neste trabalho apresentaram menor área superficial e menor volume de poros, mas por outro lado apresentaram uma maior homogeneidade. Além disso, observa-se pela análise de DRX a obtenção de um material com maior quantidade de fase amorfa, e com menor reprecipitação da fase CaF₂. Pode-se então considerar que o uso de ultrassom durante a síntese do material foi positivo em termos da homogeneidade das partículas e da distribuição do flúor no material, com possível incorporação na fase vítrea.

5.3.1.5. Avaliação *in vitro* da oclusão dos túbulos dentinários

A análise morfológica das amostras pelo MEV, após o ataque ácido dos discos de dentina, permitiu constatar que túbulos dentinários estavam abertos como observado

na figura 25. Os resultados do estudo mostraram também que os túbulos dentinários das amostras de dentina tratadas com gel contendo 1,0% de MPVBF foram parcialmente ocluídos no intervalo de 7 dias sem que fosse necessária escovação ou força mecânica conforme representado na figura 26. Em contraste, nenhuma oclusão dos túbulos dentinários foi observada na amostra controle, utilizando gel sem micropartículas. Utilizando o gel com micropartículas sem flúor ocorreu também uma obstrução parcial dos túbulos, porém com menor intensidade e após intervalo de tempo maior (14 dias).

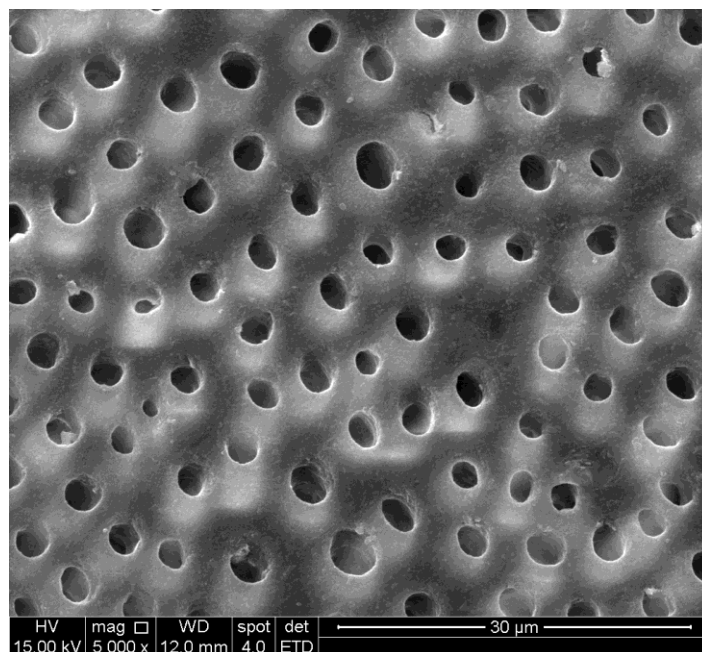


Figura 25. Imagem MEV dos discos de dentina antes do tratamento com gel com MPVBF (Micro A)

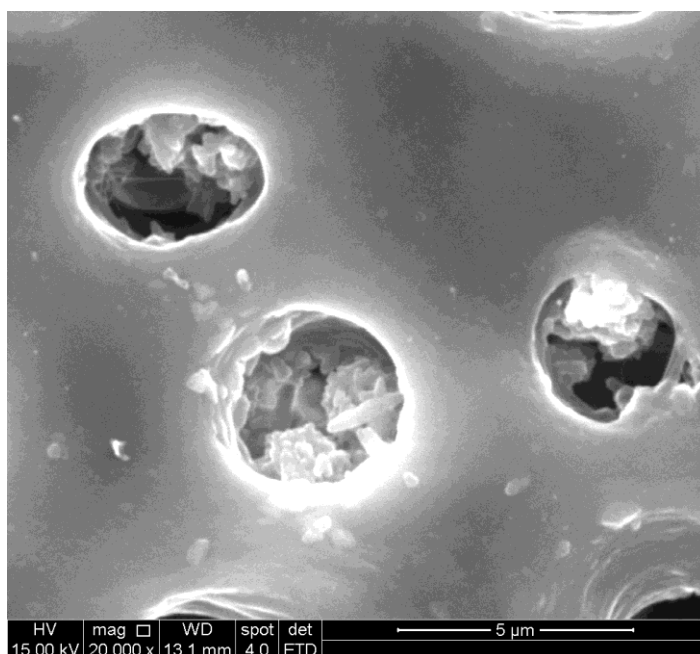


Figura 26. Imagem MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com gel com MPVBF (Micro A)

Os resultados da análise morfológica das amostras pelo MEV demonstraram que as MPVBF obtidas por sol-gel podem ser utilizadas no tratamento da HD. A sua maior área de superfície, quando comparado com as amostras densas obtidas pela rota convencional de fusão, pode aumentar a possibilidade de deposição dos cristais de apatita. Além disso, apesar da hipótese de que o flúor não tenha sido totalmente incorporado na micropartícula, a sua presença no sistema induziu a resultados mais efetivos, que pode ser justificado pela possível formação da FAP, que é mais estável que a HA (Brauer *et al.*, 2012).

5.4. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram sintetizadas as MPVB contendo fúor pela rota sol - gel. A análise de MEV e a avaliação macroscópica mostraram que as MPVBF (Micro A) apresentavam-se heterogêneas. A avaliação pontual das partículas mais rugosas por EDS indicou uma presença maior de Ca e F. A análise de DRX confirmou a hipótese de re-precipitação do CaF_2 . Sendo assim, foi proposta a síntese das MPVBF utilizando o ultrassom obtendo-se as MPVBF (Micro B). Estas partículas apresentaram menor área superficial e menor volume de poros, mas por outro lado apresentaram uma maior homogeneidade. Além disso, observou-se pela análise de DRX a obtenção de um material com maior quantidade de fase amorfa e com menor reprecipitação da fase

CaF₂. Pode-se então considerar que o uso de ultrassom durante a síntese do material foi positivo com possível incorporação parcial do Fluor na fase vítrea. Foi verificado pela análise de MEV nos testes com discos de dentina que o gel contendo MPVBF induziu a obliteração parcial dos túbulos dentinários de forma mais efetiva do que o gel com MPVB sem flúor. Sendo assim, é possível concluir que a incorporação do flúor no sistema é benéfica e que as MPVBF apresentam potencial para serem utilizadas no tratamento da HD.

6. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO FLÚOR PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA

6.1. INTRODUÇÃO

Brauer (2012) relatou a síntese do vidro bioativo contendo flúor por fusão, um processo que requer alta temperatura. Por contraste, a tecnologia sol - gel é um método de preparação em baixa temperatura, e os vidros preparados por este método têm uma estrutura porosa com uma elevada área superficial específica. O presente estudo avaliou a preparação de nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor (NPVBF) pela rota sol-gel, método de co-precipitação, por controle da concentração dos reagentes, do catalisador, álcool e pH.

Para manter a estabilidade das partículas, alguns estudos focam na obtenção de partículas de vidro bioativo esféricas para criar um material bioativo com capacidade de dispersão (Labfaf *et al.*, 2011). No presente estudo utilizou-se o polietileno-glicol (PEG), um agente tensioativo, para melhorar a dispersão das nanopartículas e/ou controlar a sua forma e o processo sol-gel foi associado simultaneamente com a técnica de ultrassom de alta intensidade a fim de se obter nanopartículas de vidro bioativo com excelente capacidade de dispersão e bioatividade.

Vidros bioativos com a composição nominal de 60% de SiO₂, 36% de CaO e P₂O₅ 4% (%em massa) têm excelente potencial para aplicações de engenharia de tecido ósseo por apresentar um nível elevado de bioatividade e desenvolvimento de uma camada de HA (Pritsos *et al.*, 2005). Assim, no presente estudo as partículas foram sintetizadas utilizando esta composição tricomponente, pela rota sol-gel, contudo, adicionando o flúor para o desenvolvimento de um material de interesse para a área odontológica.

O cálcio é um componente importante dos vidros bioativos, e no processo sol – gel para produzir vidros mesoporosos. Esta porosidade tem um grande efeito sobre a taxa de dissolução e, portanto, sobre a bioatividade do vidro. O tamanho do poro pode ser controlado pelo teor em cálcio e pela temperatura de sinterização. A adição de cálcio ocorreu durante a fase de mistura, e durante o tratamento térmico das nanopartículas

de vidro, à medida que a temperatura aumenta, o cálcio entra na rede e o nitrato e subprodutos são expulsos. Se a energia necessária é fornecida, o excesso de grupos-OH são removidos o que favorece a incorporação de Ca^{2+} na rede de vidro silicato para formar um vidro de fase única, que favorece a degradação e a bioatividade (Pritsos *et al.*, 2005). Neste estudo as NPVBF foram liofilizadas, seguindo o estudo de Oliveira (2013), no qual as amostras liofilizadas apresentaram uma estrutura com alta porosidade.

Brauer (2010, 2012) estudou os vidros bioativos contendo flúor obtidos pela rota de fusão. Foram sintetizados vidros derivados do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O}$ com quantidades crescentes de CaF_2 mantendo a conectividade de rede (CR) e a proporção de todos os outros componentes constantes. Foi avaliada também o sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ com 9,28% de flúor. A formação de apatita durante a imersão do pó de vidro em fluido corporal simulado a 37°C foi avaliada durante duas semanas, os resultados mostram que a incorporação do fluoreto resultou na formação de FAP, que é quimicamente mais estável do que a HA ou HAC e, portanto, é de interesse para aplicações odontológicas. No entanto, o aumento do teor de flúor no vidro favoreceu a formação de fluoreto de cálcio (CaF_2) às custas da FAP. Os autores relataram que pequenas adições de flúor (4,75%/mol) podem afetar a formação de apatita em SBF. Contudo, foi observado também que em uma semana, todos os vidros com concentração acima de 4,75%/mol de flúor mostraram claramente a presença de apatita por DRX. No entanto, ao aumentar o conteúdo de flúor os picos de fluorita (CaF_2) dominaram o padrão de DRX, enquanto que a quantidade relativa de apatita diminuiu. Isto pode ser explicado pelo fato de que os vidros possuíam teores baixos de fosfato (1,07 mol% ou menos), o que favorece a formação de CaF_2 , em vez de apatita, por ter um excesso de íons de cálcio e de fluoreto, mas não possuir fosfato suficiente (Brauer *et al.*, 2012).

Brauer (2010, 2011, 2012) observou também que a liberação de flúor não aumenta com o aumento do conteúdo de flúor no vidro, pois a concentração de flúor em SBF foi maior para o vidro com 9,28% de flúor do que para o de 4,75% (devido a um maior teor de CaF_2 adicionado durante a síntese) e diminuiu nas concentrações acima de 9,28%. Isto pode ser explicado pela re-precipitação de CaF_2 , que possui baixa solubilidade em água, diminuindo a liberação de flúor, apesar de uma concentração de

fluoreto mais elevada no vidro. Portanto, no presente estudo foi utilizada a concentração de 9,28% de flúor.

Um fator importante para a síntese de vidros bioativos é a conectividade de rede (CR), uma medida do número de átomos de oxigênio por rede do elemento formando um indicador de solubilidade, reatividade e bioatividade dos vidros bioativos (Gentleman *et al.*, 2013).

Lusvardi (2009) apresentou em seu trabalho que valores de conectividade de rede acima de 2,4 descrevem um vidro com uma rede altamente polimerizada, que não se degrada facilmente em meio aquoso, dificultando, portanto, que estes sistemas de vidro formem hidroxiapatita ou fluorapatita quando em contato com fluidos corporais.

Conforme Brauer (2012) relatou em seu estudo, é muito importante ter uma compreensão da estrutura do vidro para a concepção de novos vidros bioativos. Como o fósforo está presente como ortofosfato, e equilibrado por cátions modificadores (Ca^{2+} , Na^+), significa que, quando se aumenta o teor de fosfato, é preciso aumentar o teor dos modificadores proporcionalmente. Se cátions modificadores adicionais não são fornecidos, a fase ortofosfato irá remover cátions modificadores da fase do silicato, o que resultará num aumento da CR e de polimerização da fase de silicato, resultando numa diminuição drástica na bioatividade. Sendo assim, no presente estudo será utilizada a conectividade de rede no valor de 2,13 e composição similar a utilizada por Brauer (2012).

O pequeno tamanho das partículas pode ser responsável pela cristalização durante o tratamento térmico, porque a força motriz para a nucleação dos cristais aumenta com a área superficial específica. A maior cristalinidade conduz a uma taxa de dissolução inferior que tem um efeito negativo direto sobre a bioatividade (Kokubo *et al.*, 2008). É importante que o tratamento térmico não cause grande cristalização na rede de sílica, o que poderia afetar a bioatividade do material.

O flúor é o elemento mais reativo conhecido, apresenta alta eletronegatividade, formando compostos iônicos com os metais, e covalentes com não metais. A adição em uma composição vítrea simples, de pequenas quantidades de diferentes espécies de fluoretos aumenta a desordem da rede vítrea. A temperatura de transição vítrea de

vidros fluoretos está na região de 300°C, e a fusão ocorre a temperatura entre 450°C e 600°C, dependendo da composição do vidro. Fluoretos metálicos como BeF₂, CrF₃, FeF₃, AlF₃, ZrF₄, HfF₄, ThF₄, e UF₄ agem como formadores de rede em compostos vítreos, enquanto compostos como BaF₂ e NaF, mais iônicos desempenham o papel de modificadores de rede, levando à formação de ânions terminais na estrutura (Nakajima et al., 2000).

Sendo assim, após a análise dos resultados relatados na literatura, dos resultados encontrados para as partículas de vidro bioativo avaliadas no capítulo 4, e das análises realizadas para as micropartículas de vidro bioativo contendo diferentes teores de flúor apresentados no capítulo 5 deste estudo, foi proposta a síntese de um novo sistema de nanopartículas de vidro bioativo, com incorporação do flúor, sintetizados pela rota sol – gel, associada a utilização do ultrassom.

O objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar as nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor (NPVBF) e avaliar o seu potencial de remineralização “*in vitro*”, pela oclusão dos túbulos dentinários dos discos de dentina, analisando o efeito do tamanho e da composição dos vidros bioativos, e comparando com produtos existentes no mercado, com o intuito de aumentar e otimizar a eficácia do tratamento da HD.

As NPVBF foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS), Microscopia de Força Atômica (AFM), Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Granulometria por difração de laser (Cilas), Adsorção de N₂ e Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X (XPS).

Neste estudo foi sintetizado o gel com as NPVBF e realizada a sua caracterização pelo teste de MTT para avaliar a citotoxicidade. Foram utilizados dentes obtidos a partir do banco de dentes da FO-UFMG. As amostras de discos de dentina foram desmineralizadas com ácido fosfórico e tratadas no intervalo de 1, 3, 7 e 14 dias com gel contendo NPVBF. Posteriormente, as amostras foram analisadas por MEV para avaliar a oclusão dos túbulos dentinários.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Síntese das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor

A síntese das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor seguiu a metodologia anteriormente desenvolvida por Oliveira (2013), rota sol-gel método de co-precipitação, conforme representado na figura 27. Os reagentes que foram utilizados na síntese das NPVBF foram: tetraetil orthosilicato (TEOS) 98% e trietil fosfato (TEP) 99% e polietileno glicol (PEG) *Sigma-Aldrich*, nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), ácido nítrico (HNO_3) e hidróxido de amônio (NH_4OH) 33% *Merck*, metanol *Synth*. Os equipamentos utilizados foram: ultrassom de alta intensidade (200 Watts e 24 KHz), estufa de secagem, liofilizador, sistema de filtração à vácuo *Milipore* e mufla para tratamento térmico.

A síntese consistiu em dispersar 4,17 ml de TEOS e 0,14 ml de TEP em solução de 10ml de metanol e água (1:2 molar). O pH foi ajustado entre 1-2 por ácido nítrico e a mistura mantida sob agitação magnética até a obtenção de um sol transparente (aproximadamente 10 min). O sol foi então gotejado em 600 ml de solução 2% de PEG 6000 e 0,27 ml de hidróxido amônio. O pH da solução foi ajustado na faixa de 10-12 e a agitação ultra-sônica foi mantida por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado ácido nítrico ao sol para completa neutralização da amônia. A esta suspensão foi adicionada 4,3g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,31g CaF_2 e a agitação ultra-sônica foi mantida por 30 minutos. As etapas seguintes foram filtrações subsequentes em *Milipore* 0,22 e 0,11 μm e a dispersão passante nos filtros foi liofilizada. O pó fino resultante foi submetido a um tratamento térmico a 700°C por 40 min, com taxa de aquecimento de 1°C/min.

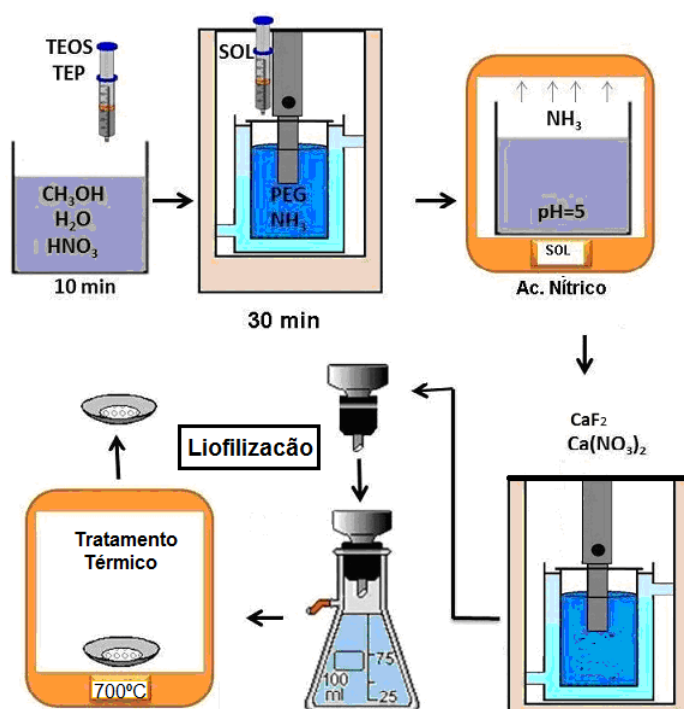


Figura 27. Representação esquemática da síntese das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor

Para realização deste estudo foram comparadas diferentes temperaturas para o tratamento térmico. Foram testadas as temperaturas de 200, 400, 700 e 900°C . Sem tratamento, a amostra após liofilização apresentava consistência pastosa e apenas após o tratamento a 700°C a amostra apresentou em forma de pó fino e claro. Sendo assim, apesar de temperaturas mais baixas evitarem a aglomeração e sinterização durante o tratamento térmico, a temperatura de 700°C foi selecionada por proporcionar melhores propriedades físicas e também para atingir a temperatura de fusão dos vidros fluoretos na tentativa de incorporar o flúor na rede do vidro.

Considerando os resultados obtidos para as micropartículas contendo flúor, e de acordo com resultados obtidos por outros autores na literatura, foi selecionada a concentração de 9,28% de flúor e a conectividade de rede de 2.13. As concentrações em (%/mol) dos componentes do vidro sintetizado estão descritos na tabela 3:

Tabela 3. Composição nominal das NPVB contendo flúor.

Componentes (%/mol)	SiO_2	P_2O_5	CaO	CaF_2
	44.88	0.97	44.87	9.28

6.2.2. Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor

As NPVBF foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS), Microscopia de Força Atômica (AFM), Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Adsorção de N₂ e Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X (XPS).

A morfologia da NPVBF foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando o equipamento Tecnai G220 FEI, equipado com Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS), para avaliar qualitativamente a composição química da amostra.

A microscopia de força atômica (MFA) foi realizada para a obtenção de uma imagem topográfica da amostra. Neste estudo foi utilizado o equipamento AFM - Park Systems -modelo XE-70, ponta de Si tipo PPP-NCHR, no modo de não contato, com força constante de 42N/m e frequência 330kHz. A preparação das amostras foi realizada adicionando o pó das NPVBF após liofilização e tratamento térmico em álcool etílico na concentração 1mg/ml, mantida agitação por 5 horas, logo após foi dispensada uma gota em uma lamínula para a análise.

A análise de Difração de Raios X (DRX) foi realizada para avaliar características estruturais das NPVBF. Os espectros foram coletados no equipamento Philips PW1700 utilizando radiação Cu-Ka ($\lambda=1,5418\text{ \AA}$) a 40kV/40mA.

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para caracterizar os grupos funcionais presentes nas amostras em estudo. Foi utilizado o equipamento Nicolet 6700, da Thermo Scientific para realização das análises. Os espectros foram coletados pela técnica ATR na faixa do infravermelho médio, foram feitas 64 varreduras entre 650 e 4000cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹ e intervalos de 2cm⁻¹.

A análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi realizada para medir o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em suspensão, antes da liofilização. O equipamento utilizado foi um Zetasizer 3000 HS 1256. Este sistema é equipado com um laser de

4mW de hélio/neon, com comprimento de onda de 633nm e mede o tamanho de partícula com a tecnologia de retroespalhamento não invasiva com um ângulo de detecção de 173°. As medições de dispersão de luz foram realizadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As medições hidrodinâmicas foram realizadas com ângulo de 90°. Os dados foram analisados de acordo com o método cumulativo para diâmetro médio aparente e índice de polidispersibilidade (PDI), o valor final foi de uma média de 10 medições. Para avaliar o tamanho da NPVBF como preparada, foi utilizada a dispersão das NPVBF como produzida, não houve necessidade de preparação prévia, pois o PEG presente na dispersão já atuou como surfactante.

As isotermas de adsorção-dessorção de N_2 foram medidas a 77K em um Quantachrome9. A área de superfície específica foi determinada com o método Brunauer-Emmett-Teller (BET), método que utiliza os pontos dos dados de adsorção na pressão relativa (P/P_0) na faixa de 0,01-0,30. A distribuição do diâmetro dos poros foi calculada pelo método BJH aplicada às curvas de dessorção. A dessorção é preferível à adsorção para estes cálculos, porque geralmente ocorre com menor pressão relativa, o que é considerado como sendo uma melhor aproximação do equilíbrio termodinâmico. Os tipos de isotermas foram avaliados de acordo com a sua forma e tipo de histerese entre os modos de adsorção-dessorção. Este método permite calcular a área superficial total da amostra através do nitrogênio adsorvido (m^2), a partir do volume de gás adsorvido em função da pressão relativa (P/P_0). A área superficial é então medida e dividida pelo peso total da amostra testada(g), afim de se obter a área superficial específica (m^2/g). O volume total dos poros é calculado através do volume de gás adsorvido para uma pressão relativa próxima da saturação ($P/P_0 \sim 1$), considerando o modelo de BET a partir de isotermas de adsorção (Weeb *et al.*, 1997).

A análise de XPS foi realizada no equipamento Specs de análise de superfície equipado com um analisador Phoibos de 150 elétrons. Uma radiação monocromática de alumínio (1486,6eV) a uma potência de 400W foram utilizadas para as análises. O sinal de 1s C (284,6eV) foi utilizado como referência para a calibração das energias de ligação de diferentes elementos para corrigir o efeito de carga. Casa XPS software foi utilizado para processar os dados de análise. As concentrações atômicas de superfície nas amostras foram estimadas usando os fatores de sensibilidade do instrumento para dimensionar as áreas dos picos dos fotoelétrons calculados. A análise de XPS identifica os elementos químicos na superfície da amostra, suas concentrações

relativas e o ambiente químico dos elementos - seus estados de oxidação. É uma técnica de análise química que fornece análise elementar e informação sobre ligações químicas. Sendo assim, esta técnica foi utilizada para definir as ligações químicas formadas pelos componentes da amostra, principalmente o flúor, e a partir desses resultados propor um modelo para explicar a incorporação e/ou interação do flúor com a rede do vidro.

6.2.3. Síntese do gel

Os materiais utilizados para a síntese do gel foram: NPVBF que foram sintetizadas neste estudo conforme descrito na sessão 6.2.1, hidroximetilcelulose (HMC), e solução que simula o fluido corporal (SBF) que foi preparada seguindo a norma ISO/FDIS 23317:2007 (E). Ao SBF foram adicionadas as NPVBF na concentração de 0,2% m/m, que foi selecionada de acordo com os resultados obtidos para as NPVB sem flúor estudadas no capítulo 4, e com o intuito de tentar obter um bom resultado utilizando a menor concentração de nanopartículas, e na concentração de 1% m/m para critério de comparação durante teste de MTT. A HMC foi adicionada na concentração de 1,5% m/m, que é a concentração usualmente utilizada na composição das formulações dos agentes dessensibilizantes dentinários. Esta mistura foi agitada por 10 minutos para atingir uma consistência de gel e tornar-se homogênea, conforme apresentado na figura 28. Foi sintetizado também o gel utilizando as MPVBF (Micro B) estudadas no capítulo 5 a 0,2% m/m para a realização do estudo comparativo entre as duas amostras na análise do teste de MTT e a avaliação *in vitro* da oclusão dos túbulos dentinários.

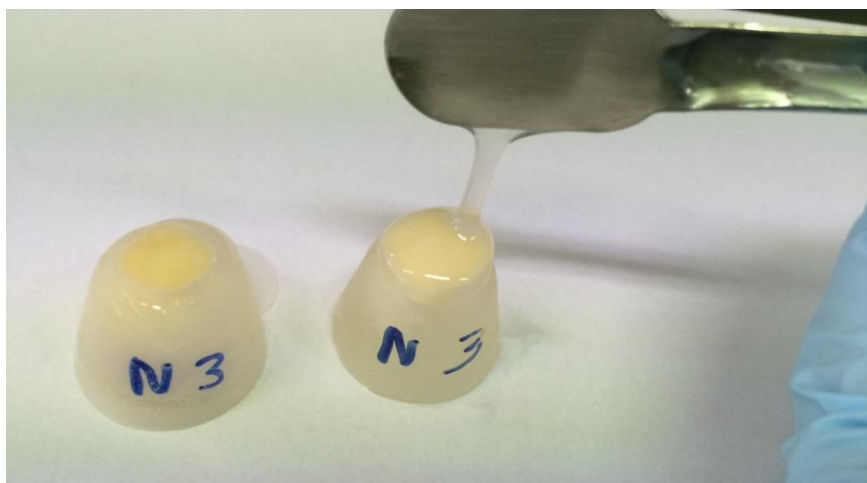


Figura 28. Imagem do gel contendo NPVBF

6.2.4. Preparação dos discos de dentina

Foram utilizados neste estudo dentes obtidos a partir do banco de dentes da FO-UFMG. Os dentes foram seccionados de forma paralela, ligeiramente abaixo da junção esmalte-dentina, mesio - distalmente em discos utilizando brocas diamantadas com refrigeração e posteriormente embutidos em blocos de resina acrílica, conforme figura 29. Posteriormente foram submetidos a uma sequência de lixas para obter uma superfície lisa. As amostras foram então colocadas em um frasco contendo água deionizada, e sonicada durante 30 minutos para remover o abrasivo de polimento. Após sonicção, as amostras foram lavadas com água e os discos foram armazenados em hipoclorito de sódio até serem utilizados.



Figura 29. Imagem dos discos de dentina embutidos em resina acrílica

6.2.5. Teste *in vitro* para avaliação da oclusão dos túbulos dentinários

Para realização dos testes, os discos de dentina foram condicionados com ácido fosfórico 37% durante 1 minuto. Após o ataque, as amostras foram lavadas com água deionizada e, em seguida colocadas em um frasco contendo água deionizada e sonicadas mais uma vez por 30 minutos.

Posteriormente cada amostra foi inserida em um tubo falcon com 20ml de gel a 0,2% com NPVBF e mantida em banho a 37°C. O gel foi trocado diariamente e aplicado com uma escova dental, simulando uma escovação, conforme demonstrado na figura 30. Este experimento foi realizado em duplicata para cada um dos tempos (1, 3, 7 e 14 dias).

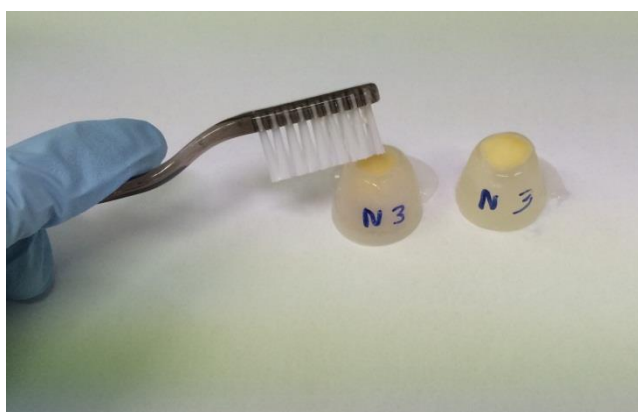


Figura 30. Imagem demonstrando a aplicação do gel contendo NPVBF nos discos de dentina

Foi realizado também um teste com grupo controle utilizando o mesmo gel, porém, sem nanopartículas. Posteriormente as amostras foram lavadas novamente com água deionizada, colocados no sonicador por 30 minutos e mantidos na estufa a 40°C por 24hs para secagem.

O mesmo procedimento descrito para as NPVBF foi realizado para critério de comparação também com as MPVBF sintetizadas com ultrassom (Micro B) sintetizadas no capítulo 5 deste trabalho e os resultados serão apresentados neste capítulo.

6.2.6. Caracterização do gel - Ensaio de citotoxicidade

Foi realizado o teste com MTT para avaliar a citotoxicidade do gel contendo NPVBF e MPVBF. O teste foi realizado com osteoblastos e seguiu as normas da ISO 10993 (Parte 5 – Testes de citotoxicidade *in vitro*).

Cultura de osteoblastos. As células de linhagem de sarcoma osteogênico humano (SAOS) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Alfredo Goes do departamento de imunologia e bioquímica da UFMG. As células foram cultivadas em *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) com 10% de soro fetal bovino, penicilina G sódica (10une/mL), sulfato de estreptomicina (10mg/ml) e 0,25 anfotericina-b todos da (Gibco BRL, NY, EUA), em estufa de CO₂ a 5% a 37°C. As células utilizadas para os experimentos foram da passagem sete.

MTT. Células SAOS da passagem sete foram plaqueadas (1 X10⁴ células / poço) em placa de 24 poços. As populações celulares foram sincronizadas em meio sem soro durante 24 horas, após este período, o meio foi aspirado e substituído por meio contendo soro fetal bovino (SFB). O gel com NPVBF (0,2%) e o gel com MPVBF (1%) foram diluídos no meio de cultura nas concentrações de 5, 10, 20, 15, e 25% para avaliar o efeito da concentração/quantidade do gel na citotoxicidade. As amostras foram esterilizadas por radiação UV por 40 minutos em fluxo estéril. Foram utilizados como controle de referência DMEM com 10% de SFB, como controle positivo Triton X-100 (1%) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e como controle negativo lascas de 'ependorf'. Após 72 horas todo o meio foi aspirado e trocado por 210µL de meio de cultura com soro. Foram acrescentados 170µL de MTT (5mg.mL⁻¹; SIGMA-ALDRICH, USA) em cada poço e incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida foram colocados 100 µL de solução de isopropanol/ 4% HCL. Depois, foram retirados 100µL de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços plana e a quantificação da absorbância foi feita em Varioskan Reader (Thermo Scientific) com filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula: Viabilidade celular (%) = (absorbância das células em contato com as amostras X 100) / (absorbância do controle). Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de viabilidade celular.

Foi realizado o mesmo procedimento, utilizando as diluições no meio de cultura nas concentrações de 5, 15, e 25% das amostras NPVBF (0,2%) e MPVBF (0,2%) para

avaliar a diferença de citotoxicidade entre as micropartículas e as nanopartículas contendo flúor.

Análise estatística. Os experimentos foram realizados com $n=3$ ($p<0,05$ análise estatística: one way / ANOVA / Bonferroni / GraphPadPrism).

6.2.7. Caracterização dos discos de dentina

Os discos de dentina foram caracterizados utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios-X (EDS).

As amostras de dentina foram examinadas por MEV antes e após o tratamento com o gel com NPVBF e com MPVBF. Antes do tratamento os discos de dentina foram examinados por MEV, para assegurar que os túbulos da dentina estavam abertos. As amostras foram então examinadas após o tratamento, para determinar o efeito dos géis contendo NPVBF e MPVBF.

Após a avaliação da oclusão dos túbulos por MEV, as amostras foram analisadas por EDS para análise qualitativa da composição elementar do material no interior dos túbulos. Esta análise foi realizada sobre a área ocluída.

Para critério de comparação e controle dos resultados, os testes *in vitro* foram também realizados com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio® e Sensodyne Repair & Protect® que já estão sendo comercializadas para utilização no tratamento da HD.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor

6.3.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Dispersão de Energia

A figura 31 apresenta as microfotografias das partículas obtidas, após liofilização e tratamento térmico, e a figura 32 mostra o respectivo EDS. A avaliação qualitativa do diâmetro médio e forma das partículas sugere a obtenção de partículas esféricas na escala nanométrica. A análise do EDS indicou a presença do flúor no sistema.

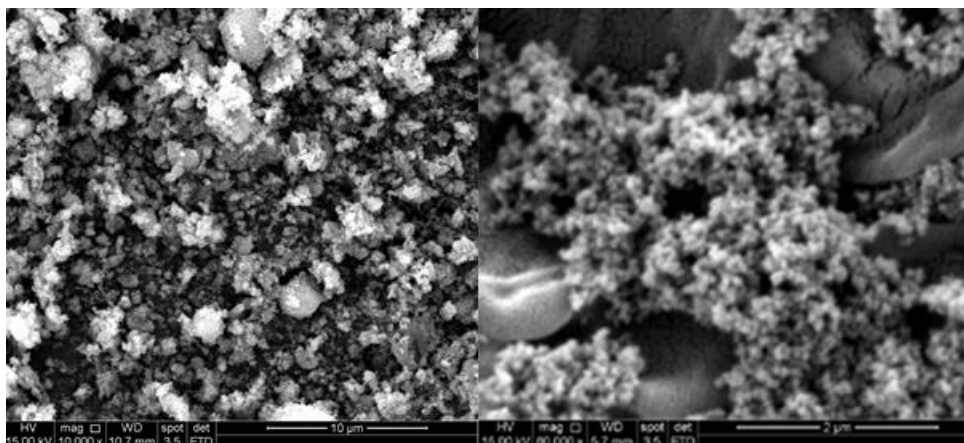
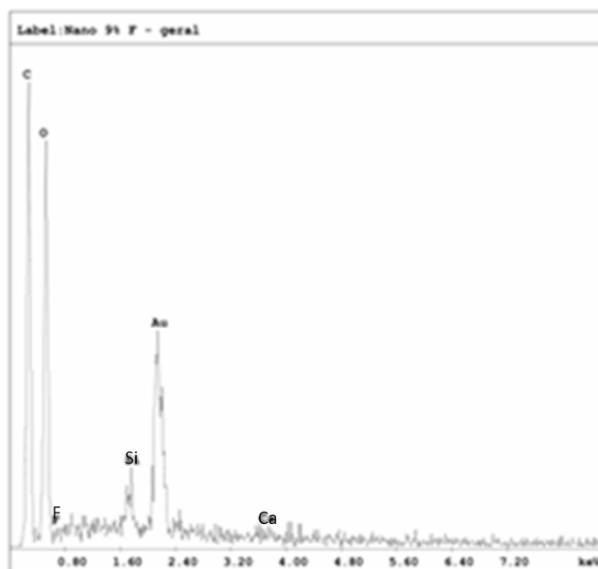


Figura 31. Microfotografia NPVBF 9,28%



Elemento	%
F	23.5
Ca	26,3
Si	50.2

Figura 32. Espectro de EDS das NPVBF 9,28%

6.3.1.2. Análise do tamanho e morfologia das nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor

As medidas de DLS para as NPVBF em suspensão, antes da liofilização e tratamento térmico, foram ilustradas na figura 33. A análise cumulativa para a NPVBF apresentou uma média de diâmetro das partículas de $5,3\pm 0,3\text{nm}$ e um baixo índice de polidispersidade (PDI) de $0,15\pm 0,02$, o que indica uma homogeneidade de distribuição do tamanho das partículas.

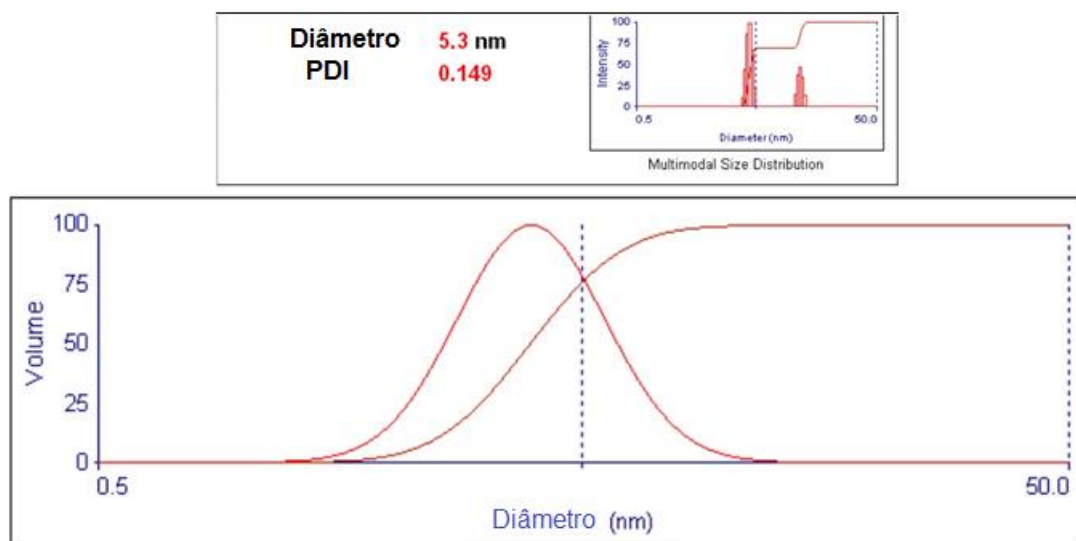


Figura 33. Análise de DLS das NPVBF

A análise de MFA foi usada para avaliar as NPVBF após liofilização e tratamento térmico a 700°C . Foi obtida uma imagem com as medidas (para avaliação do tamanho das NPVBF), uma imagem tridimensional e uma imagem da topografia da amostra, conforme apresentado nas figuras 34, 35 e 36 respectivamente.

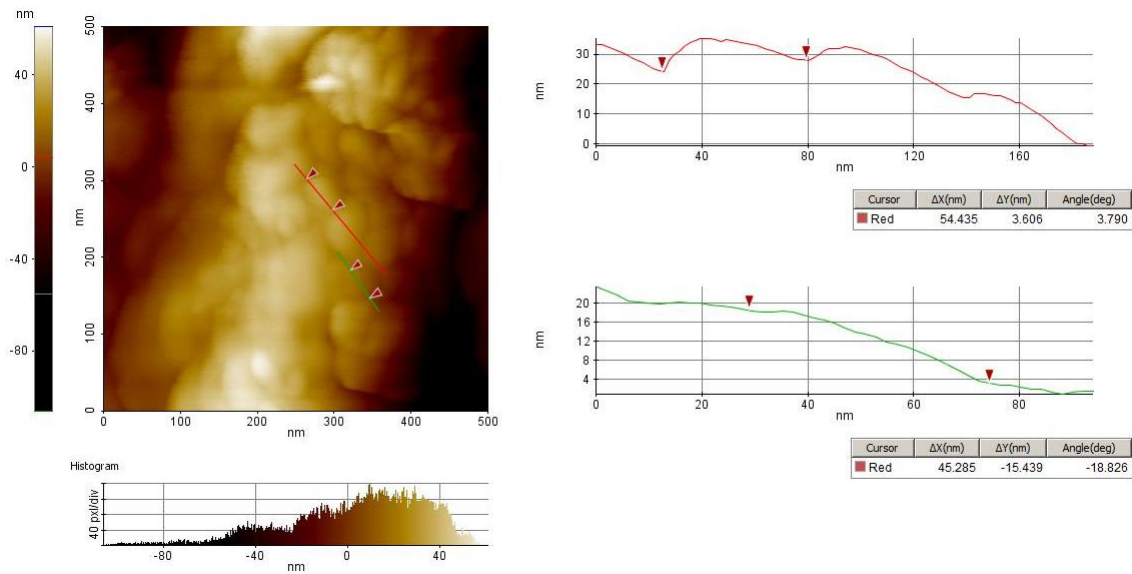


Figura 34. Imagem de MFA das NPVBF e análise do tamanho das partículas

A figura 34 apresenta uma imagem das NPVBF marcada por setas para mostrar o tamanho das partículas. São apresentados também os referentes gráficos e histograma. Foi possível observar que as NPVBF apresentaram tamanho aproximado entre 45 e 55nm.

Estes resultados são importantes para a aplicação desejada, pois, os diâmetros dos túbulos dentinários variam de 2-3 μm (próximo a polpa) à 0.5-0.9 μm (próximo a junção amelo-dentinária) (Shiau, 2012; Tonetto *et al.*, 2012). Sendo assim, a obtenção de partículas com tamanho reduzido favorece a deposição das mesmas no interior dos túbulos o que pode otimizar os resultados. Considerando que o principal mecanismo de ação dos vidros bioativos é a liberação de cálcio e fosfato para resultar em supersaturação dos fluidos ao redor e, posteriormente, precipitação de cristais de HAC, contribuindo para aumentar os processos de remineralização, sugere-se que com a utilização das nanopartículas esse processo ocorra diretamente no interior dos túbulos, o que pode proporcionar uma obliteração dos túbulos mais efetiva, com maior espessura e em maior profundidade, ao invés de ocorrer somente na superfície de abertura dos túbulos. Além disso, com a presença do flúor a FAP é formada, que é mais estável nas condições ácidas da cavidade bucal que a HAC (Lynch *et al.*, 2011; Brauer *et al.*, 2010, 2011, 2012). Portanto, as NPVBF avaliadas neste estudo

apresentam um potencial para proporcionar uma ação mais duradoura e sustentável para o tratamento da HD.

Outra característica importante que pode ser observada na figura 34 é o formato esférico apresentado pelas NPVBF, pois, um inconveniente para a utilização dos vidros bioativos na forma particulada incorporado a produtos de higiene oral - principalmente daqueles em que o uso envolve escovação ou fricção - é o poder cortante das partículas vítreas devido às suas superfícies extremamente irregulares, pontiagudas e afiadas. Essa característica das partículas vítreas é resultante das múltiplas fraturas do material durante o processo de moagem para a produção dos pós com a granulometria desejada. Dessa forma, as partículas de vidro moído podem provocar microcortes na gengiva, causando a sua irritação e, possivelmente, o aumento de sensação dolorosa nos pacientes (Tirapelli *et al.*, 2007). Considerando-se essas questões, a obtenção de partículas em escala manométrica e com formato esférico são de grande interesse para a incorporação dos vidros bioativos em produtos de higiene oral, já que são mais regulares, menos abrasivas e desprovidas de superfícies cortantes, portanto, menos agressivas ao tecido gengival e às mucosas. Essas características constituem uma grande vantagem para a sua utilização nos procedimentos destinados ao tratamento da HD, principalmente nos casos em que são envolvidos escovação e atrito na região de atuação.

A figura 35 que apresenta uma imagem tridimensional e a figura 36 que apresenta a imagem topográfica da amostra permite observar que a superfície era rugosa e que ocorreu uma aglomeração e/ou sinterização das partículas.

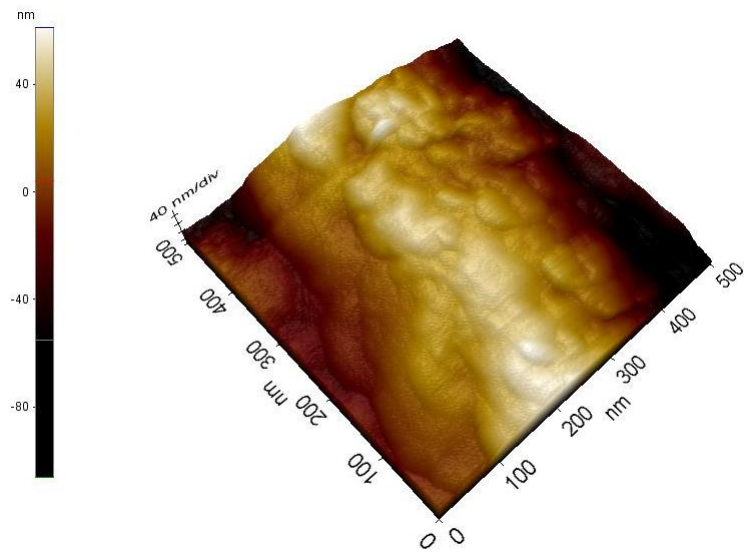


Figura 35. Imagem tridimensional das NPVBF obtidas por MFA

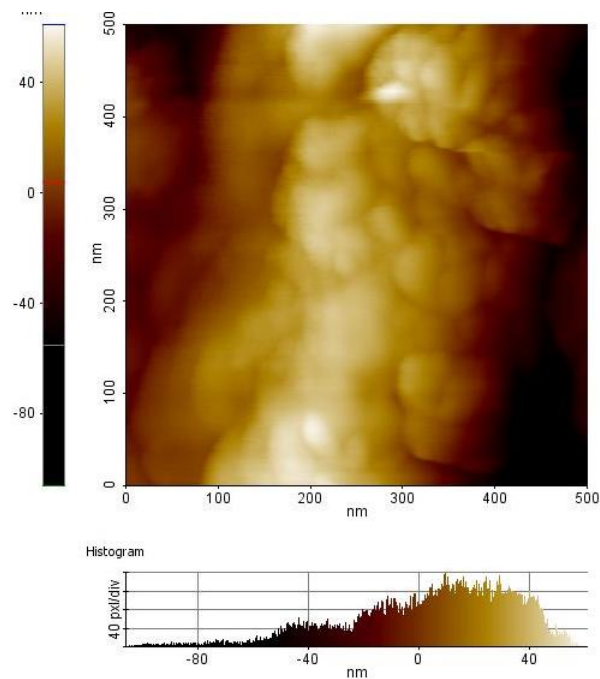


Figura 36. Imagem topográfica das NPVBF obtidas por MFA

Comparando os resultados obtidos para o tamanho das partículas na análise de DLS ($5,3 \pm 0,3\text{nm}$), da amostra em suspensão, e o resultado da análise de MFA (entre 45 – 55nm) da amostra após o tratamento térmico, observa-se um aumento significativo do tamanho. Este aumento no diâmetro das partículas ocorreu provavelmente devido à grande área de superfície das nanopartículas, o que leva a uma força motriz grande o

suficiente para produzir crescimento, por coalescimento ou outro mecanismo. Além disso, observa-se também pelas imagens de MFA que o sistema de nanopartículas após tratamento térmico apresenta-se aglomerado ou agregado, podendo ter ocorrido sinterização parcial com o aumento da temperatura. Durante a secagem e tratamento térmico, ocorrem ligações entre os materiais e as moléculas de água resultando em agregação secundária: partículas pequenas desaparecem e pequenos poros são preenchidos, de modo que ocorre uma diminuição da área interfacial e o tamanho médio dos poros aumenta. Este processo não produz retração, porque os centros das partículas não se movem em relação uns aos outros, de modo que as partículas podem aumentar de tamanho (Silva *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2009).

Partículas finas, principalmente na escala nanométrica, possuem grandes áreas superficiais e frequentemente aglomeram formando partículas secundárias, a fim de minimizar a superfície total ou a energia interfacial do sistema. A aglomeração refere à adesão de partículas que ocorrem devido às forças de atração de Van der Waals, as quais são significativamente maiores em nanopartículas. Normalmente, uma massa aglomerada pode ser desaglomerada por meio de uma dispersão em um meio líquido. Já a agregação, refere-se a partículas que sinterizam incipientemente, tornando difícil a quebra da massa agregada em partículas primárias (Reed, 1994).

Sendo assim, sugere-se que as NPVBF apresentaram uma aglomeração após liofilização e tratamento térmico, podendo ter ocorrido também sinterização parcial do sistema. A fim de minimizar a agregação secundária, a liofilização foi usada para remover a água a partir da interface do material e o tratamento térmico foi realizado com tempo reduzido. Entretanto, estudos adicionais precisam ser realizados para determinar as condições de síntese e tratamento térmico adequadas, que minimizem o processo de aglomeração e/ou agregação do sistema de nanopartículas produzido.

6.3.1.3. Difração de Raio X

Como foi discutido no capítulo 5, as análises de DRX das micropartículas de vidro bioativo com diferentes concentrações de flúor 0%, 9%, 27% e 36% sintetizadas sem ultrassom (micro A), sugerem que o flúor não foi incorporado na rede do vidro, ocorrendo a precipitação do CaF_2 como uma fase separada. Comparando o espectro de DRX, que apresenta as curvas normalizadas, da amostra das micropartículas sem

flúor com as micropartículas contendo flúor nas diferentes concentrações, é possível supor que houve uma redução na fase amorfa e um aumento da cristalinidade nas amostras contendo flúor, este resultado foi observado também por Brauer (2010). A amostra de MPVBF contendo 9% de flúor apresentou padrão intermediário, com região amorfa e picos cristalinos, sendo assim, este resultado também fundamentou a seleção da composição das nanopartículas com 9,28% de flúor.

A figura 37 mostra os espectros de DRX para as MPVBF (Micro B) e NPVBF, ambas com 9,28% de flúor e tratadas à temperatura de 700°C, além dos difratogramas padrões do CaF_2 e do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Pode ser observado que a amostra NPVBF contendo 9% de flúor apresentou picos cristalinos nos valores aproximados de 29°, 34° e 46°, atribuídos à HA e à FAP. Os padrões de DRX da FAP sobrepõe aos da HA e HAC, e, portanto, não é possível distinguir entre essas duas fases com base apenas na análise de DRX (Brauer *et al.*, 2010). A presença destes picos pode ser explicada, segundo Oliveira (2013) com base em dois fatos diferentes. Em primeiro lugar, no ambiente aquoso do processo sol – gel pode ocorrer a precipitação de HA a partir da estrutura amorfa dos vidros bioativos, e conseqüentemente, neste estudo, também em fluorapatita, devido a presença do flúor. Uma segunda hipótese é que a temperatura utilizada no tratamento térmico foi suficiente para aumentar a mobilidade dos íons Si, Ca e P na estrutura de vidro resultando na cristalização do material, uma vez que a cristalização começa na superfície e as nanopartículas possuem alta área de superfície (Hong *et al.*, 2009). O espectro das MPVBF (Micro B) apresentou banda entre 15° e 40° referente à sílica amorfa, e picos similares ao do CaF_2 . É possível supor que os picos referentes à apatita e à fluorapatita possam estar sobrepostos a banda de sílica amorfa. Esta hipótese será discutida posteriormente, juntamente com a análise de XPS (Brauer *et al.*, 2010).

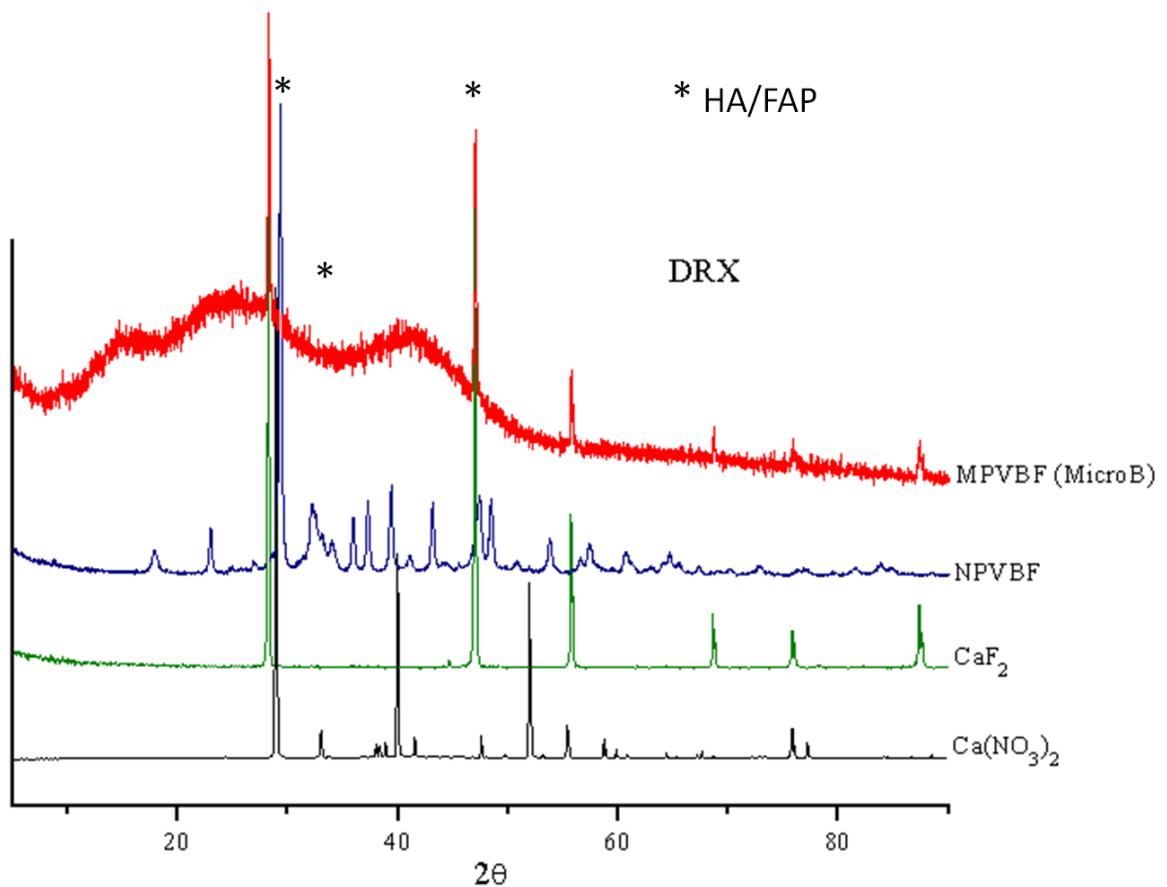


Figura 37. Espectros de DRX das MPVBF (Micro B) e NPVBF com 9% de flúor

Outra vantagem da presença do flúor nos vidros bioativos e que foram relatadas em trabalhos da literatura é que as temperaturas de transição e de cristalização do vidro diminuem com a incorporação do flúor ao vidro bioativo. À medida que a temperatura de transição vítrea é dependente da força de ligação no vidro, esta diminuição da temperatura de cristalização indica uma rede menos fortemente ligada. No entanto, como a conectividade de rede, ou seja, o número médio de pontes de oxigênio formada por elemento de rede permanece constante, essa ligação mais fraca deve estar relacionada a uma reticulação iônica mais fraca entre os cátions modificadores e oxigênios que estão fora da ponte. A incorporação do flúor no vidro bioativo resultaria na formação de unidades estruturais CaF^+ . Estas unidades hipotéticas CaF^+ fornecem menor reticulação iônica do que os íons Ca^{2+} , e, portanto, a adição de flúor reduziria a temperatura de transição, a viscosidade e temperatura de cristalização, semelhante aos cátions monovalentes, modificadores de rede, como o Na^+ (Brauer *et al.*, 2012).

6.3.1.4. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A figura 34 mostra os espectros de FTIR das NPVBF e MPVBF tratadas a 700°C. As bandas a 1200 e 1090 cm^{-1} estão associadas com os modos de vibração transversal e longitudinais respectivamente, de compostos com 4-8 átomos de Si na rede. A banda a 1160 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico P-O. A partir de 1350-850 cm^{-1} , uma banda pode ser observada e inclui o alongamento assimétrico de Si-O-Si de 1050-1070 cm^{-1} , o alongamento de Si-O- no $[\text{SiO}^-/\text{Ca}^{2+}]$ em 960-980 cm^{-1} , e a flexão da ligação OH e o alongamento SiO no grupo Si-OH em 880 cm^{-1} . Pode ser observado um deslocamento da banda no espectro das NPVBF, em comparação com o das MPVBF, a números de onda mais baixos. Esta mudança pode ser atribuída à alta densidade dos grupos Si-O- e Si-OH nas nanopartículas (Oliveira *et al.*, 2013).

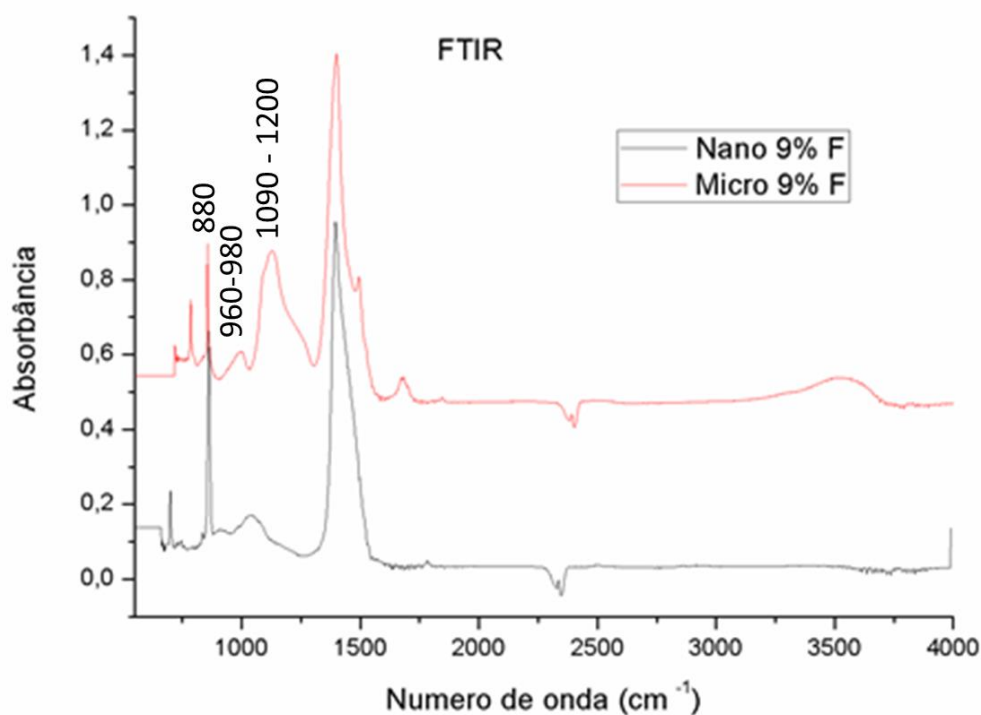


Figura 38. Espectro de FTIR das NPVBF e FMPVB 9% (Micro B) de flúor

6.3.1.5. Adsorção de N₂

A figura 39 mostra as isotermas de adsorção/dessorção de N₂ para NPVBF. A análise de BET das NPVBF mostrou como a escala nanométrica afeta a estrutura dos poros e a área de superfície.

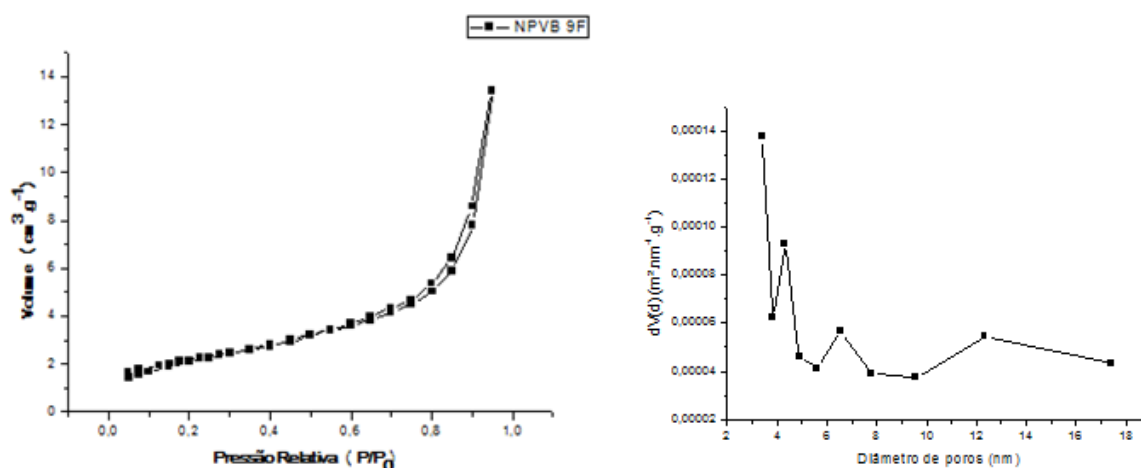


Figura 39. Isotermas de adsorção/dessorção de N₂ e análise BJH das NPVBF

As isotermas das NPVBF produzidas podem ser identificadas como do tipo V, caracterizada por mesoporos absorvidos com fraca afinidade. O ciclo de histerese do tipo H1 (quase imperceptível) indica que os canais dos poros não apresentam constrições, e que de outra forma dão origem ao tipo H2 de histerese devido ao efeito de bloqueio/percolação dos poros, e, portanto, levaria a desvios da histerese tipo H1. O tipo H1 é freqüentemente associado com materiais porosos conhecidos, constituídos por aglomerados ou por esferas compactas, aproximadamente uniformes, em um conjunto bastante regular, e, portanto, têm distribuições estreitas de tamanho dos poros (Zhu *et al.*, 2008).

Os resultados, que podem ser observados na tabela 4 mostraram que as NPVBF apresentaram menor área de superfície e menor volume de poros quando comparadas com as MPVBF, o que pode ser explicado pelo fato de que o ultrassom foi utilizado durante toda a síntese das NPVBF e apenas na etapa de mistura dos componentes da solução precursora das MPVBF. Sendo assim, as características dos sonogéis estão mais presentes nas NPVBF, tais como maior densidade e estrutura homogênea.

Tabela 4. Valores de área superficial e volume de poro das NPVBF e MPVBF

	MPVBF 9% Micro B	NPVBF 9%
Área superfície	73.148 m ² /g	10.215 m ² /g
Volume de poro	0.148 cc/g	0.022 cc/g

6.3.1.6. Espectroscopia de Fotoelétrons de raios X

A análise das propriedades superficiais de um biomaterial é de extrema importância, pois é na superfície que ocorrem as interações do biomaterial com o meio biológico. Neste trabalho investigou-se a composição da superfície das nanopartículas e micropartículas de vidro bioativo por meio da técnica de XPS.

Os espectros de XPS estão sendo representados por picos devido ao emprego do software (casa XPS). A identificação dos elementos presentes na superfície foi feita diretamente pela determinação das energias de ligação dos picos fotoelétricos. A posição de cada pico indica o estado químico do átomo emissor.

As superfícies das amostras das NPVBF e das MPVBF apresentaram composição química com picos associados aos íons Ca, P, O, Si, e F consistentes com a composição química do material produzido neste trabalho, e de carbono devido à contaminação da amostra com carbono de origem orgânica e por carbonato (inerente da técnica de XPS).

A Figura 40 mostra os espectros completos das amostras de nanopartículas de vidro bioativo contendo 9% de flúor (NPVBF), das micropartículas de vidro bioativo contendo 9% de flúor (Micro A) e das micropartículas de vidro bioativo contendo 9% de flúor sintetizadas com ultrassom (Micro B). Os picos presentes nos espectros são associados aos íons Ca, Si, P, F, O. Os dados associados relacionados aos átomos presentes, e a posição e concentração atômica nas amostras estão apresentados na tabela 5.

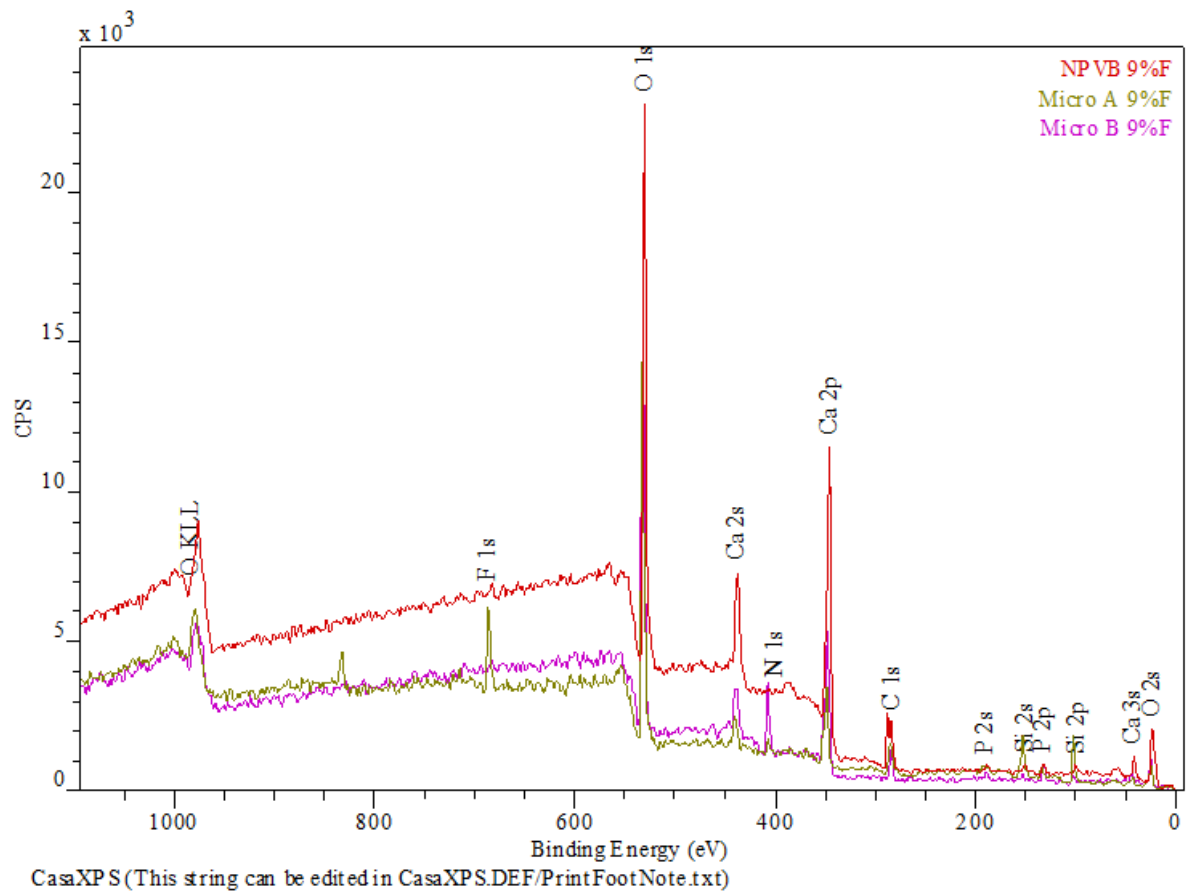


Figura 40. Espectro XPS completo das amostras NPVBF 9%, Micro A 9%F e Micro B 9%F

Tabela 5. Resultados obtidos por XPS dos átomos presentes, posição e concentração atômica nas amostras NPVBF e MPVBF(Micro A e B)

Amostra	Átomo	Posição	Concentração Atômica (%)
NPVB 9%F	O 1s	530,88	51,63
	Ca 2p	346,38	19,75
	C 1s	288,67	21,69
	F 1s	684,72	0,50
	P 2p	131,96	2,17
	Si 2p	100,07	4,26
Micro A	O 1s	532,88	49,30
	Ca 2p	348,88	8,11
	C 1s	284,57	12,57
	F 1s	686,41	6,92
	P 2p	133,26	2,51
	Si 2p	102,61	17,80
	N 1s	407,27	2,79
Micro B	O 1s	533,13	54,64
	Ca 2p	347,83	12,62
	C 1s	284,83	11,94
	F 1s	683,83	1,07
	P 2p	133,03	3,88
	Si 2p	102,33	3,15
	N 1s	407,63	12,69

A figura 41 mostra uma região específica do espectro das amostras de nanopartículas de vidro bioativo contendo 9% de flúor (NPVBF), das micropartículas de vidro bioativo contendo 9% de flúor (Micro A) e das micropartículas de vidro bioativo contendo 9% de flúor sintetizadas com ultrassom (Micro B). Nessa região, os picos presentes nos espectros são associados ao íon flúor.

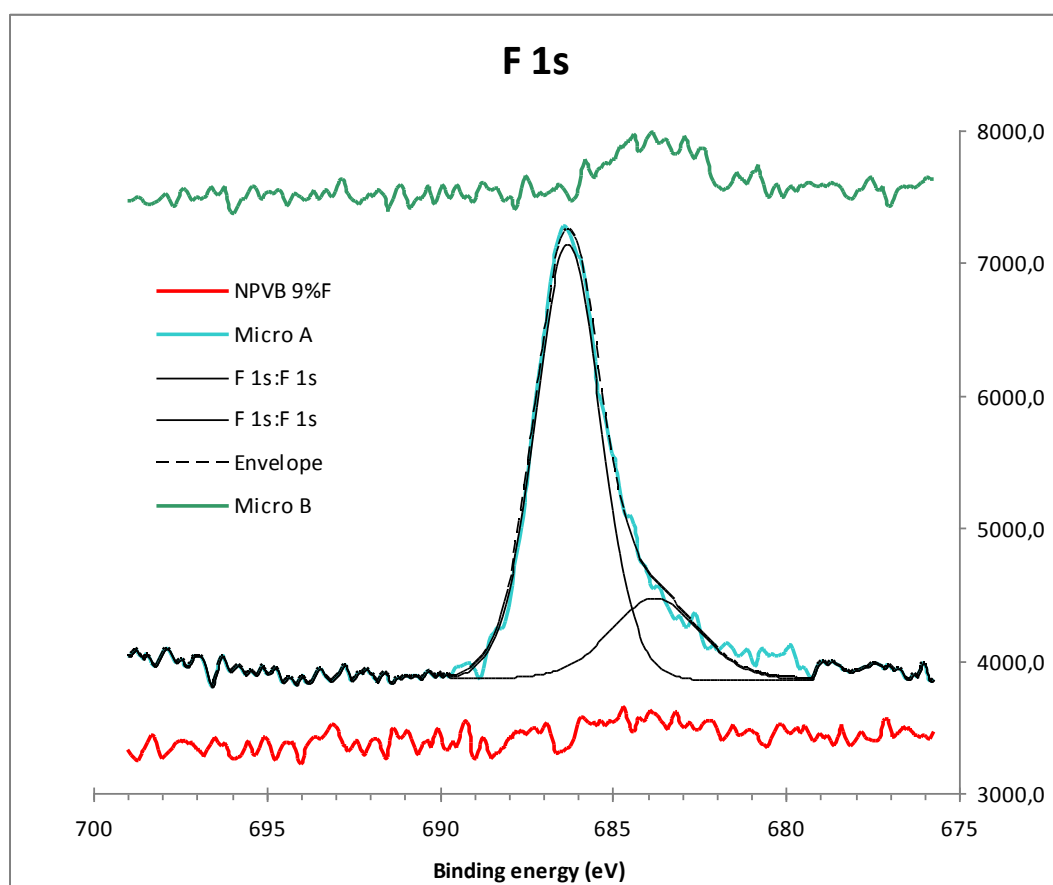


Figura 41. Espectro XPS das amostras NPVBF 9%, Micro A 9%F e Micro B 9%F associados ao íon flúor

De acordo com os resultados obtidos por Cheng (2005), em seu estudo que avaliou pela técnica de XPS recobrimentos de fluorapatita, foi observado no perfil do XPS que existia apenas F1s para F em FAP (em 684,2 eV), e nenhum traço de F em CaF_2 (em 686,7eV) concluindo-se, portanto, que a fase CaF_2 não estava presente. Os resultados do trabalho de Cheng são resumidos na Tabela 6. Comparando estes resultados com os obtidos no presente estudo, mostrados na Tabela 5 e Figura 41, é possível presumir que ocorreu a precipitação do CaF_2 apenas na amostra de MPVBF sintetizadas sem ultrassom (Micro A) e formação de cristais de fluorapatita nas amostras de MPVBF sintetizadas com ultrassom (Micro B) e nas NPVBF.

Tabela 6. Composto químico e a energia de ligação associada

Composto químico	Energias de ligação (eV) Flúor
CaF₂	686,7
FAP	684,2

Referências: Handbook, K. Cheng et al. / Surface & Coatings Technology 198 (2005) 237–241.

Estes resultados conferem com os resultados encontrados nas análises de DRX para as NPVB e para a amostra Micro A. O espectro de DRX das NPVBF apresentou picos cristalinos referentes à hidroxiapatita e à fluorapatita e a amostra Micro A apresentou espectro de DRX semelhante ao CaF₂. Por outro lado, a análise de DRX da amostra Micro B mostrou a presença de banda amorfa e picos referentes à presença da fase CaF₂, enquanto a fase detectada por XPS dessa amostra foi a FAP. Assim, para a amostra Micro B é possível supor que na análise de DRX os picos referentes à fluorapatita estavam sobrepostos pela banda de sílica amorfa ou que não foram detectados devido a uma baixa concentração, e que de forma similar a fase CaF₂ não foi detectada por XPS, possivelmente por ser esta uma técnica localizada, de análise de superfície, que pode não representar completamente o material. Contudo, os resultados conjuntos das duas técnicas utilizadas no presente trabalho, DRX e XPS, permitem afirmar que ocorre a presença das duas fases, FAP e CaF₂, na amostra Micro B. Lusvardi (2009) investigou um sistema semelhante de vidro e relatou a formação de fluorapatita (Ca₅(PO₄)₃F), bem como fluorita (CaF₂) quando os vidros foram submetidos a tratamento térmico, de forma similar ao encontrado para as partículas Micro B.

Os resultados da análise de XPS permitem afirmar que os picos cristalinos apresentados na análise de DRX, nos valores aproximados de 29°, 34° e 46°, inicialmente atribuídos tanto à HA quanto à FAP, devido à sobreposição dos padrões de DRX, são da FAP, confirmando a sua presença, contudo não descarta a presença também da HA. Este resultado é muito importante para o objetivo deste estudo, que é a utilização deste material na área odontológica.

Estes resultados também são coerentes com os obtidos por autores que sintetizaram micropartículas de vidro bioativo contendo flúor pela rota de fusão. Lusvardi (2009) e Bogdanov (2009) mostraram a cristalização da apatita nos vidros bioativos contendo flúor e que a cristalização de uma fase apatita parece depender do teor de fosfato no

vidro, sendo que, com baixo teor de fosfato, os vidros bioativos contendo flúor não formam FAP mediante tratamento térmico.

Brauer (2012) caracterizou a estrutura do vidro e o comportamento da cristalização, a fim de desenvolver vidros bioativos que cristalizam a FAP. No momento do tratamento térmico, os vidros foram cristalizados com a mistura de sódio ortofosfato e de fluoreto de cálcio (composições contendo sódio) e fluorapatita (composição isenta de sódio). O fluoreto suprimiu a cristalização espontânea, permitindo a formação de um vidro cerâmico por cristalização controlada. Uma característica notável é que a polimerização da rede de silicato e a conectividade de rede não se alteraram durante a cristalização, resultando em cristais de ortofosfato e fluorapatita incorporados dentro de uma matriz de vidro bioativo. Sendo assim concluíram que ao manter o teor de fosfato elevado e o teor de sódio baixo, a vitrocerâmica de fluorapatita pode ser obtida, não afetando a estrutura da fase do vidro silicato bioativo.

Considerando os resultados obtidos pelas análises de DRX e XPS e considerando os resultados obtidos relatados na literatura, sugere-se que também ocorreu a formação de cristais de fluorapatita incorporados no interior da matriz do vidro bioativo quando realizada a síntese com ultrassom de nano e micropartículas contendo flúor pela rota sol gel. Contudo mais estudos são necessários para avaliar e definir melhor a estrutura e distribuição de fases desses materiais.

Este sistema desenvolvido é de grande importância para a odontologia, pois os vidros bioativos já são clinicamente utilizados como enxertos ósseos e também são de interesse para uso como revestimentos de implantes, em dentifrícios, e em todas estas aplicações a adição de flúor seria benéfica. O flúor é bem conhecido para evitar as cáries dentárias inibindo a desmineralização do esmalte e da dentina, aumentando a remineralização e inibindo enzimas bacterianas. Vidros cerâmicos contendo a FAP como fase cristalina são de grande interesse para aplicações odontológicas e ortopédicas, por apresentar melhor osteointegração e osteocondução. Se os cristais de FAP são incorporados em uma matriz de vidro bioativo, os materiais têm o potencial para combinar os benefícios da fase cristalina osteocondutiva da FAP com as propriedades ósseo-regenerativas da fase do vidro bioativo (Orchardson *et al.* 2006; Chiau, 2012).

A Figura 42 mostra a região do espectro de XPS que contém os picos identificados como sendo correspondentes ao Ca 2p que são próprios da fase da HA e FAP (Dourado, 2006). Por meio desses espectros obteve-se a energia de ligação referente aos picos do Ca 2p e a concentração atômica estimada de Ca na superfície das amostras. Esses resultados são apresentados na tabela 6. A energia de ligação (eV) associada ao Ca para o composto CaF_2 é de 347,5 – 348 (Handbook), valor mais próximo do apresentado pelas amostras Micro A e B.

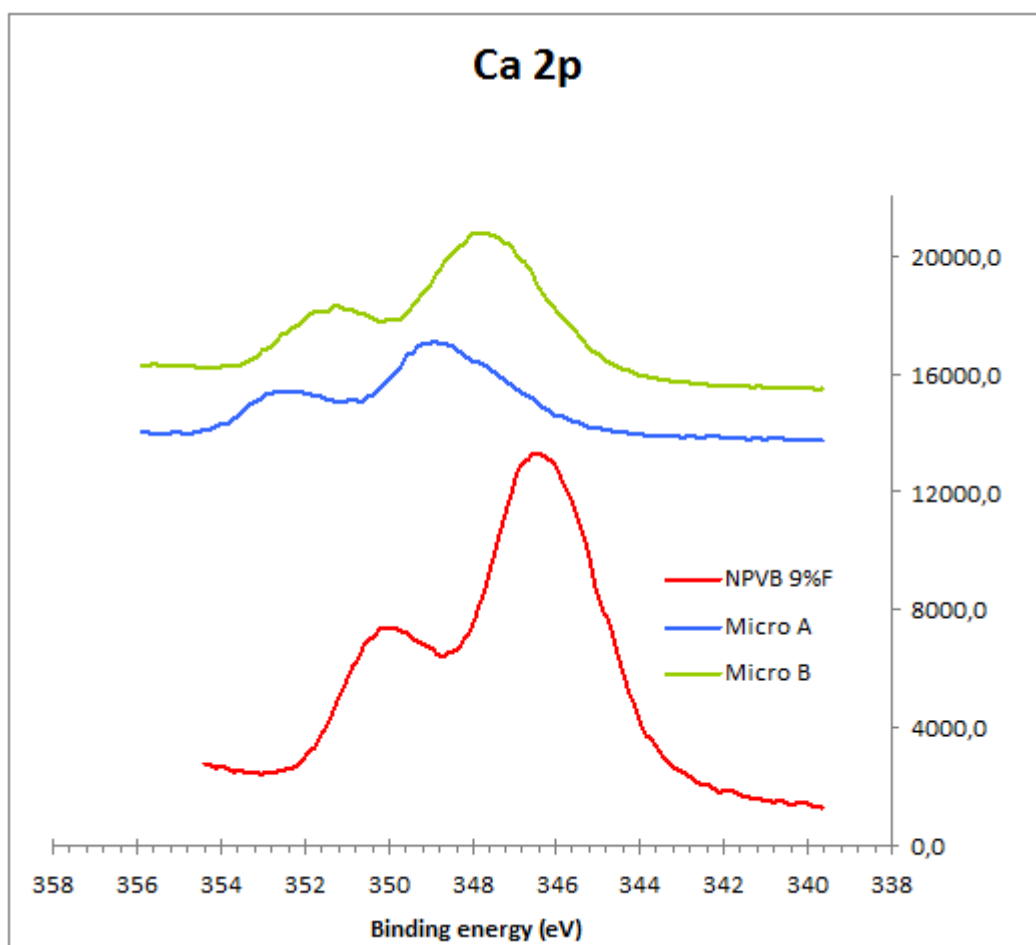


Figura 42. Espectro XPS das amostras NPVBF 9%, Micro A 9%F e Micro B 9%F associados ao íon cálcio

A principal aplicação destinada a este novo sistema, um gel contendo nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor é como componente aditivo remineralizante de dentífricos. Neste estudo, conforme já relatado, a formação de FAP é preferível por ser quimicamente mais estável em pH mais baixo em comparação com HA e/ou HAC. O vidro bioativo presente no dentífrico precisa executar sua função de formar FAP antes de ser lavada pela ação da saliva. Idealmente deve-se constituir FAP na boca

em 8h, correspondendo a um período noturno, onde o fluxo salivar será mínimo. Fluoretos (como fluoreto de sódio, fluoreto de amônio ou sódio monofluorofosfato) são comumente adicionados aos dentífricos, no entanto, o sal de flúor solúvel é susceptível a provocar uma alta concentração de flúor antes que a concentração de cálcio seja aumentada pela dissolução do vidro e, portanto, há mais probabilidade de resultar na formação de fluoritas indesejáveis (CaF_2), que podem competir ou inibir com a formação FAP subseqüentes. Portanto, é preferível entregar os íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- simultaneamente na quantidade adequada para formar FAP a partir de uma composição de vidro, a fim de evitar a possível formação de CaF_2 (Brauer *et al.*, 2012). Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho, são de grande importância, pois já poderia haver liberação dos cristais de FAP que estão incorporados na matriz de vidro bioativo. Além disso, é possível que a dissolução da FAP possa levar à liberação de mais íons F^- simultaneamente com os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , para formação de FAP na superfície da dentina e nos túbulos dentinários.

6.3.2. Caracterização do gel – Ensaio de Citotoxicidade

Na figura 43 podemos observar que após 3 dias as células em contato com a amostra (gel contendo 0,2% de NPVBF) nas diluições de 5 e 25% não apresentaram diferença significativa na viabilidade em relação a condição controle. Entretanto as células em contato com a amostra (NPVBF 0,2%) nas diluições de 10, 15 e 20% apresentaram um aumento estatisticamente significativo na viabilidade de $48 \pm 8\%$, $50 \pm 5\%$ e $45 \pm 17\%$ respectivamente em relação ao grupo controle. As células SAOS em contato com a amostra (NPVBF 1%) nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25% também apresentaram um aumento estatisticamente significativo na viabilidade de $46 \pm 24\%$, $87 \pm 14\%$, $80 \pm 9\%$, $84 \pm 8\%$ e $121 \pm 32\%$ respectivamente em relação à condição controle. Comparando as duas amostras, nas mesmas concentrações consideradas no estudo (5, 10, 15, 20 e 25%) não ocorreu diferença significativa de viabilidade celular entre os géis contendo 1% e 0,2% de NPVBF. Sendo assim, foi selecionado o gel contendo 0,2% de NPVBF para a realização dos testes *in vitro* para avaliar a oclusão dos túbulos dentinários, com o propósito de utilizar a menor quantidade de nanopartículas para a obtenção dos resultados.

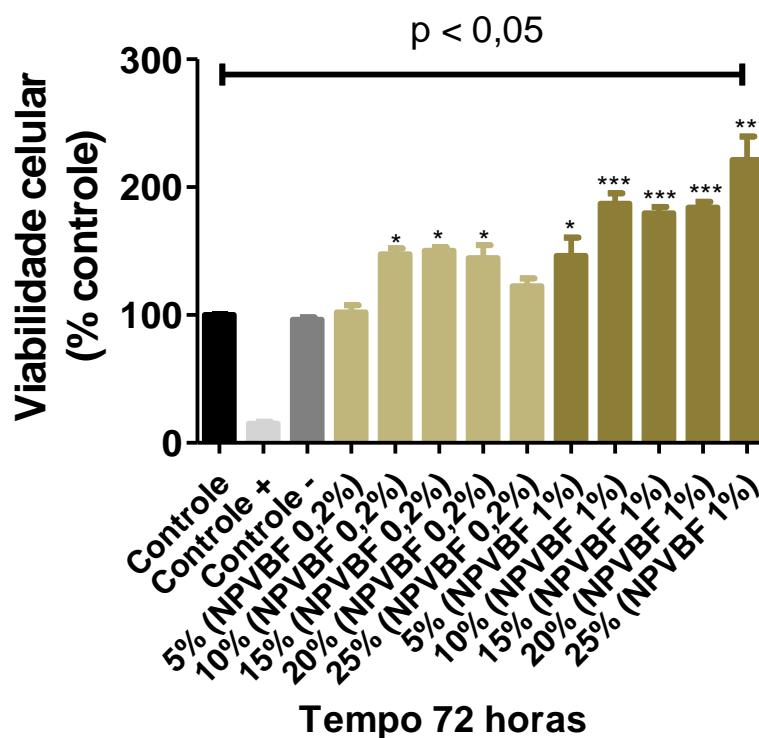


Figura 43. Gráfico do ensaio MTT após 72 horas de contato das células SAOS com as amostras (NPVBF 0,2%) e (NPVBF 1%).

Na figura 44 podemos observar que após 3 dias as células em contato com as amostras (gel contendo 0,2% de NPVBF) e (gel contendo 0,2% MPVBF) na diluição de 5%, não apresentaram diferença significativa na viabilidade em relação a condição controle. Entretanto as células em contato com a amostra (gel contendo 0,2% de NPVBF) nas diluições de 15 e 25% apresentaram um aumento estatisticamente significativo na viabilidade de $38 \pm 8\%$, $26 \pm 3\%$ respectivamente em relação ao grupo controle. E a amostra (gel contendo 0,2% de MPVBF) nas diluições nas concentrações de 15 e 25% apresentou um aumento estatisticamente significativo na viabilidade de $18 \pm 2\%$ e $18 \pm 1\%$ respectivamente em relação ao grupo controle. Ao realizar a comparação entre as amostras, não ocorreu diferença significativa quando analisada as diluições de 5 e 25%. Analisando a comparação entre as amostras na diluição de 15%, verificou-se um aumento na viabilidade da amostra (gel contendo 0,2% de NPVBF) de 20% em relação à amostra (gel contendo 0,2% de MPVBF).

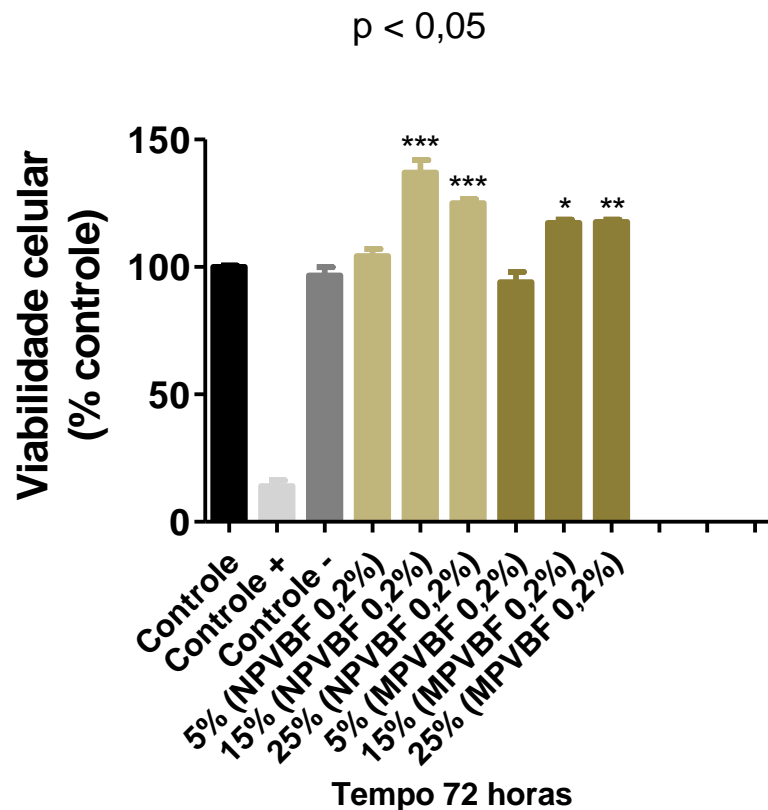


Figura 44. Gráfico do ensaio MTT após 72 horas de contato das células SAOS com as amostras (NPVBF 0,2%) e (MPVBF 0,2%).

Estes resultados mostraram que os géis estudados não apresentam toxicidade e ambos os géis provocaram aumento significativo na viabilidade celular, portanto pode-se considerar que os géis contendo NPVBF e MPVBF produzidos neste estudo apresentam potencial para serem utilizados no tratamento da HD. Contudo é necessária a realização de outros testes, inclusive testes *in vivo*, para embasar mais estes resultados.

O gel contendo NPVBF apresentou uma maior viabilidade celular que o gel contendo MPVBF, este resultado confirma mais uma vantagem em se utilizar nanopartículas quando comparadas com as micropartículas. Oliveira (2013) também concluiu em seu trabalho que as NPVB apresentaram cinética de deposição da camada de hidroxiapatita e viabilidades celulares significativamente maiores que as micropartículas.

6.3.3. Avaliação *in vitro* da oclusão dos túbulos dentinários

6.3.3.1. Avaliação *in vitro* da oclusão dos túbulos dentinários utilizando gel contendo nanopartículas de vidro bioativo com flúor

Para este experimento foi utilizado o gel contendo 0,2% de NPVBF, com concentração de flúor de 9,28% no vidro bioativo.

A análise morfológica das amostras pelo MEV, após o ataque ácido dos discos de dentina, permitiu constatar que túbulos dentinários estavam abertos como observado na figura 45.

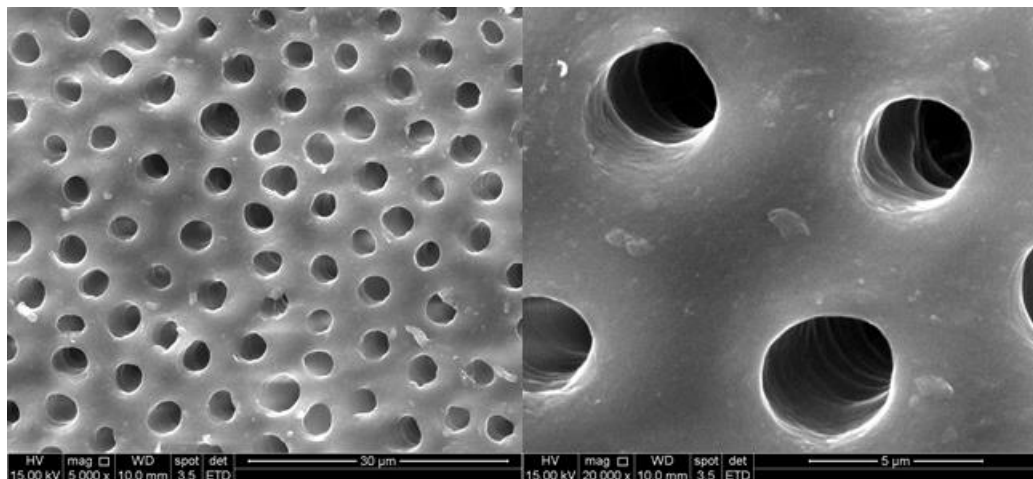


Figura 45. Imagem de MEV dos discos de dentina após ataque ácido.

Os resultados do estudo mostraram que os túbulos dentinários das amostras de dentina tratadas com gel contendo 0,2% de NPVBF foram ocluídos no intervalo de 1dia após aplicação do gel com escova dental simulando uma escovação dentária, conforme apresentado na figura 46.

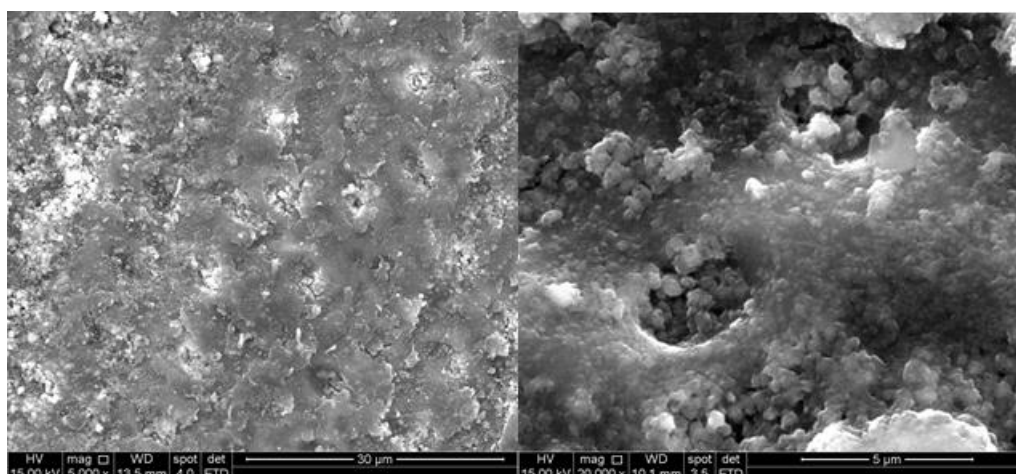


Figura 46. Imagem de MEV dos discos de dentina após 1 dia de tratamento com gel com NPVBF 9%F.

As aplicações do gel foram repetidas diariamente e os resultados dos tempos 3, 7 e 14 dias estão apresentados nas figuras 47, 48 e 49 respectivamente.

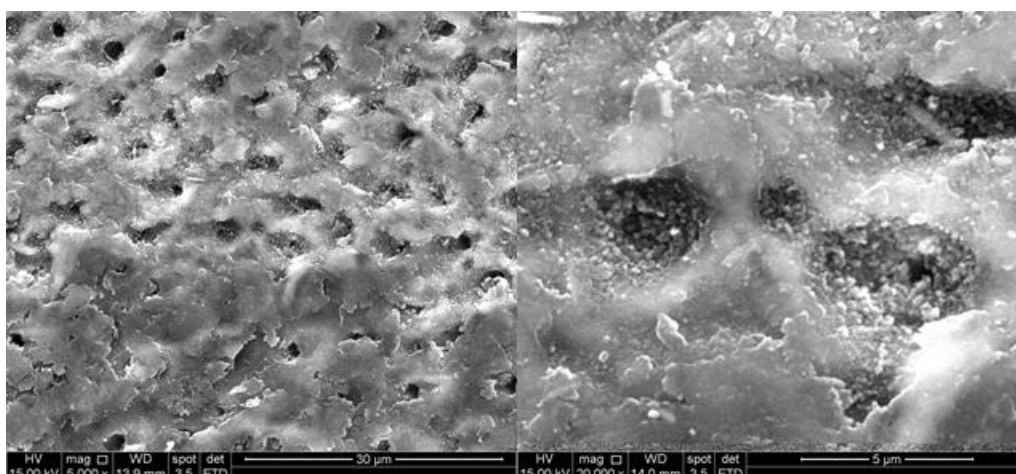


Figura 47. Imagem de MEV dos discos de dentina após 3 dias de tratamento com gel com NPVBF 9%F.

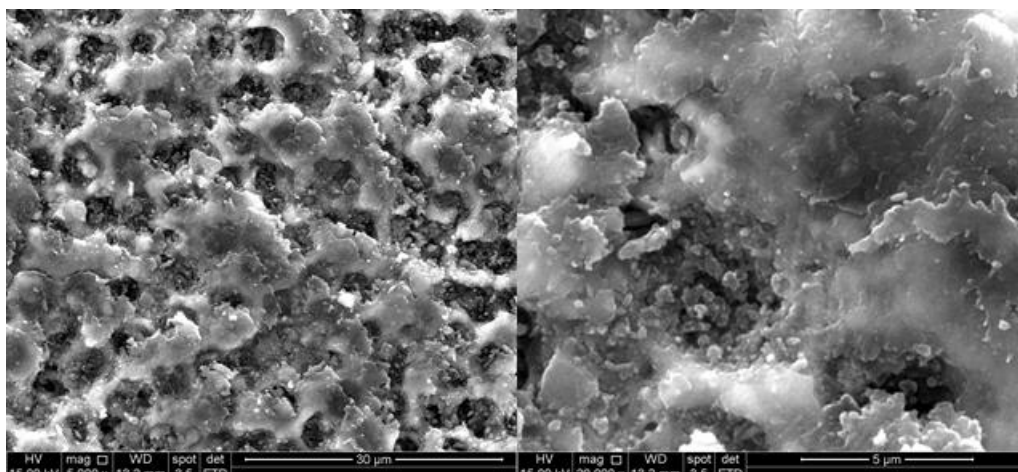


Figura 48. Imagem de MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com gel com NPVBF 9%F.

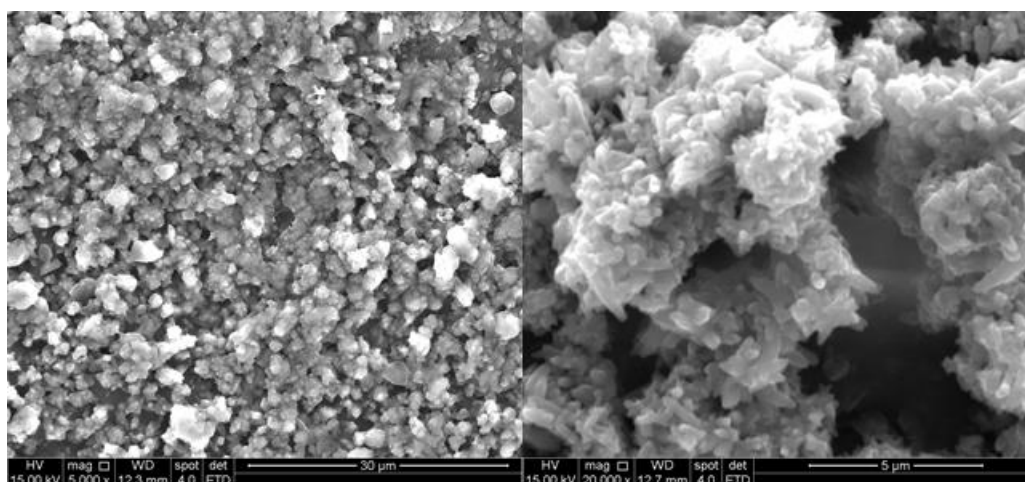


Figura 49. Imagem de MEV dos discos de dentina após 14 dias de tratamento com gel com NPVBF 9%F.

Nas micrografias foi observado o aumento gradativo do depósito do material, formando uma camada na superfície da dentina, também fora dos túbulos, provavelmente partículas de vidro bioativo e cristais de hidroxiapatita e/ou fluorapatita, resultando em oclusão completa dos túbulos, ilustrando a capacidade dos vidros bioativos para a oclusão dos túbulos dentinários. Na imagem de MEV, figura 49, referente ao intervalo de 14 dias, na maior ampliação (20.000X), verificou-se mais claramente a presença dos cristais semelhantes à hidroxiapatita e/ou fluorapatita.

No intervalo de 14 dias é possível observar também que não só os túbulos foram ocluídos, ocorreu o recobrimento total da superfície, sendo assim é possível inferir que o gel contendo NPVBF apresenta potencial para a liberação de íons cálcio e flúor na superfície do dente que está vulnerável à desmineralização, reduzindo o risco de

desenvolvimento da doença cárie. Conforme relatado por Davis (2014), os íons cálcio e flúor são conhecidos por serem benéficos para a remineralização e fortalecimento do tecido dentário e o flúor também funciona como um agente contra a presença de *Streptococcus mutans* (microorganismo responsável pelo desenvolvimento da doença cárie) na cavidade oral (Davis *et al.*, 2014).

Outro benefício da incorporação do flúor no VB, que foi relatada por outros autores é a provável liberação terapêutica dos íons flúor na cavidade bucal, que atuaria na prevenção de cáries, o que torna as NPVBF sintetizadas neste estudo um interessante componente para ser incorporado em cremes dentais. O desenvolvimento de novos materiais que liberem esses íons na superfície dental ao invés de apenas aumentar a concentração destes íons na saliva é de grande utilidade, pois seus efeitos são maximizados quando os íons estão localizados na superfície do dente que está vulnerável à desmineralização (Lynch *et al.*, 2011; Brauer *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2014).

Davis (2014) concluiu em seu trabalho que avaliou a incorporação de vidro bioativo contendo flúor em resinas, com o objetivo de formular um composto para atuar como reservatório de íons cálcio e flúor. Os resultados apresentaram a liberação de cálcio e flúor, além da recarga de flúor para o sistema.

A oclusão dos túbulos dentinários é uma abordagem atualmente utilizada no tratamento da HD, e vários produtos com diferentes princípios ativos têm se mostrado capazes de ocluir túbulos *in vitro*. Embora existam vantagens da utilização desses produtos pela facilidade de disponibilidade e custo (ao consumidor), uma grande desvantagem é que eles podem levar até 2-4 semanas para atingir qualquer eficácia no alívio dos sintomas da HD (Brauer *et al.*, 2012). Com base nesta informação, é possível supor que o sistema NPVBF contendo 9% de flúor melhorou significativamente a formação de AP e/ou FAP, favorecendo o tratamento de HD pela oclusão dos túbulos dentinários com maior rapidez.

A HD está relacionada ao fluxo de fluidos dentro dos túbulos dentinários, e de acordo com a Lei de Poiseuille o movimento deste fluido é diretamente proporcional à quarta parte do raio. Como consequência qualquer redução no raio de abertura dos túbulos levaria a uma redução da permeabilidade dentinária e como tal deve ser eficaz no

tratamento HD (Lynch *et al.*, 2011). Sendo assim, a caracterização *in vitro* da capacidade de formação de AP e/ou FAP desse novo sistema utilizando gel com NPVBF é muito importante na investigação do seu potencial para uso em dentifrícios remineralizantes.

A análise por MEV fornece fortes evidências para a capacidade das NPVBF para remineralização dentinária e redução da dor causada pela HD. Esta técnica, no entanto, não permite saber, com precisão, se obliteração dos túbulos dentinários acarretou também a inibição do movimento do fluido no interior dos túbulos, que é a causa da resposta dolorosa. Sendo assim, é necessária a realização de experimentos que analisem a condutividade hidráulica no interior dos túbulos em trabalhos futuros.

A análise de EDS da amostra após 14 dias de tratamento, apresentado na figura 50, mostrou a presença de forma qualitativa dos elementos destes compostos, apenas o flúor não foi identificado em uma concentração significativa, contudo esta técnica de análise não é a mais indicada para verificar a presença do flúor. Foi observada a presença da sílica, o que indica que não ocorreu a dissolução completa do vidro bioativo neste intervalo de tempo. Observou-se também a presença do Ca, P e O que indica que houve deposição de fosfato de Ca no interior dos túbulos dentinários. Seria necessária a realização de outras técnicas de caracterização para confirmar se o material depositado no interior dos túbulos é mesmo a HA e/ou FAP, mas a partir da análise das imagens de MEV, da análise de DRX realizada no capítulo 4, e dos demais resultados apresentados neste estudo e nos estudos relatados na literatura é possível supor que ocorreu a deposição de HA e/ou FAP no interior dos túbulos.

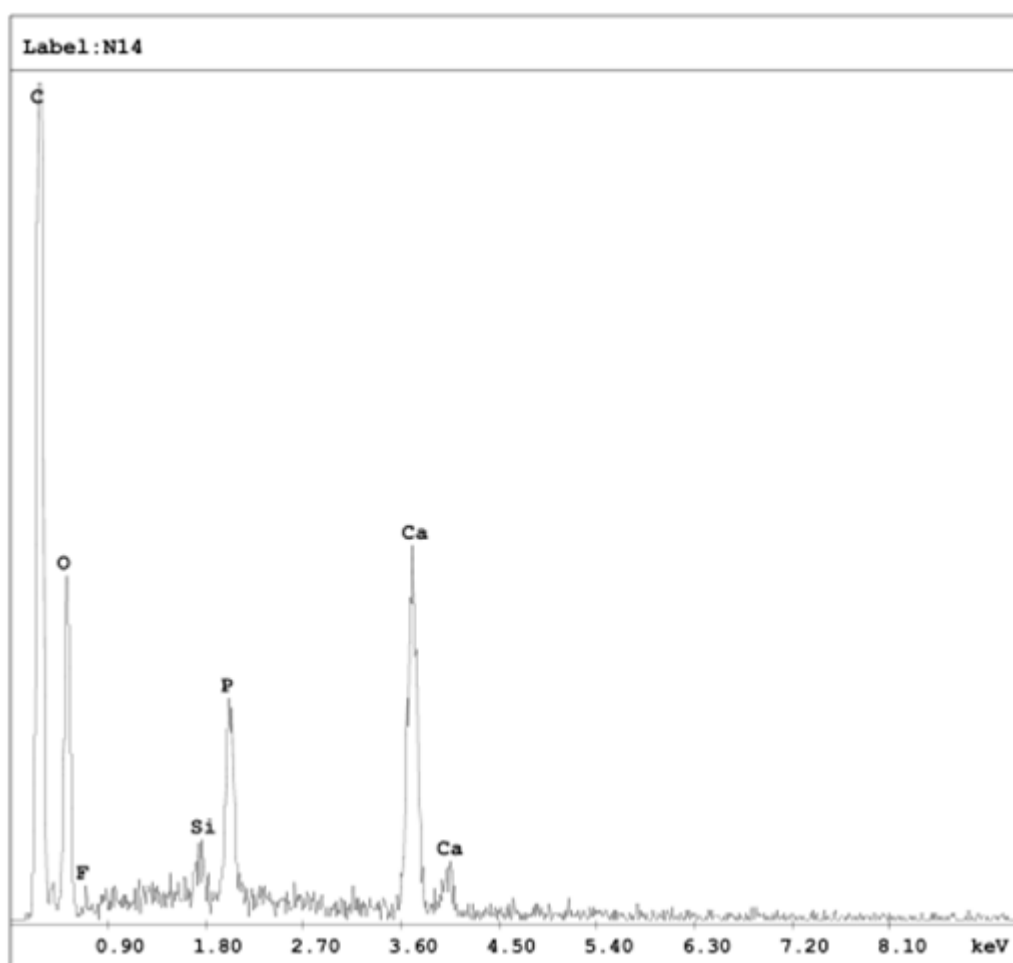


Figura 50. Análise EDS do disco de dentina após 14 dias de tratamento com gel NPVBF

Em contraste, nenhuma oclusão dos túbulos dentinários foi observada na amostra controle, utilizando gel sem nanopartículas, representada na figura 51.

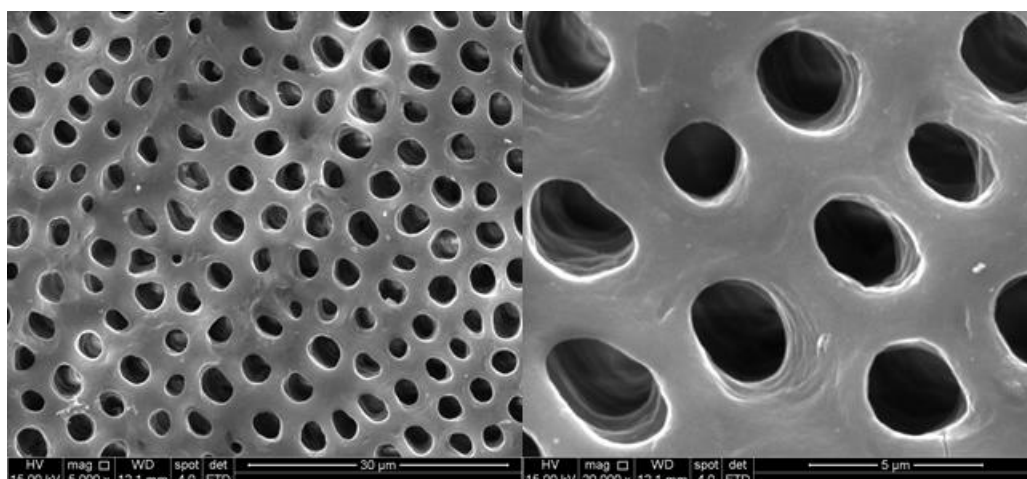


Figura 51. Imagem MEV dos discos de dentina após 14 dias tratamento com gel sem NPVBF

O principal mecanismo de ação dos vidros bioativos em dentifrícios é a liberação de cálcio, fosfato e, no presente estudo, os íons de flúor resultando na supersaturação dos fluidos ao redor (como saliva) e, posteriormente, precipitação de cristais de apatita. Lynch (2011) e Brauer (2012) relataram que este mecanismo, com a presença do flúor, pode aumentar os processos de remineralização dentro da cavidade oral. Brauer (2012) avaliou que nos vidro bioativos contendo flúor, sem a presença de sódio, as unidades de ortofosfato estão com as cargas balanceadas apenas com o Ca^{2+} , resultando na cristalização da fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}$) após tratamento térmico.

Os resultados do MEV do presente estudo mostram também que, além de um aumento geral da remineralização, vidros bioativos apresentam o potencial de ocluir diretamente os túbulos dentinários através da formação da apatita, e devido à presença do flúor, a formação da fluorapatita, que é mais estável e resistente a ácidos, apresentando, portanto, características para ser empregado na prevenção e tratamento da HD.

Lynch (2011) apresentou em seu estudo imagens de MEV dos tubulos dentinários ocluídos após 1 semana de tratamento com micropartículas de vidro bioativo contendo flúor obtidos pela rota de fusão em tampão Tris. Comparando com os resultados obtidos neste estudo, é possível inferir que as NPVBF com 9% de flúor, sintetizadas pela rota sol-gel apresentaram uma maior reatividade e alcançaram a oclusão dos túbulos dentinários com taxas mais rápidas, em 1 dia. E este tempo poderá ser ainda mais reduzido se levarmos em consideração que a formação de apatita será mais

rápida na cavidade oral, na presença de saliva, que contém íons cálcio e fosfato adicionais, mesmo que em concentrações variadas. Futuros estudos deverão realizar testes *in vitro* com saliva artificial ou *in vivo* para confirmar esta hipótese.

6.3.3.2. Avaliação *in vitro* da oclusão dos túbulos dentinários utilizando gel contendo micropartículas de vidro bioativo com flúor (Micro B)

Foi realizado o mesmo experimento utilizando o gel com 0,2% de MPVBF (Micro B), com concentração de flúor de 9% no vidro bioativo com o objetivo de comparar os resultados obtidos, e se há diferença quando se utiliza micro e nanopartículas.

Os resultados do estudo mostraram que os túbulos dentinários das amostras de dentina tratadas com gel contendo 0,2% de MPVBF 9% foram ocluídos parcialmente no intervalo de 1 dia após aplicação do gel com escova dental simulando uma escovação dentária, conforme apresentado na figura 52.

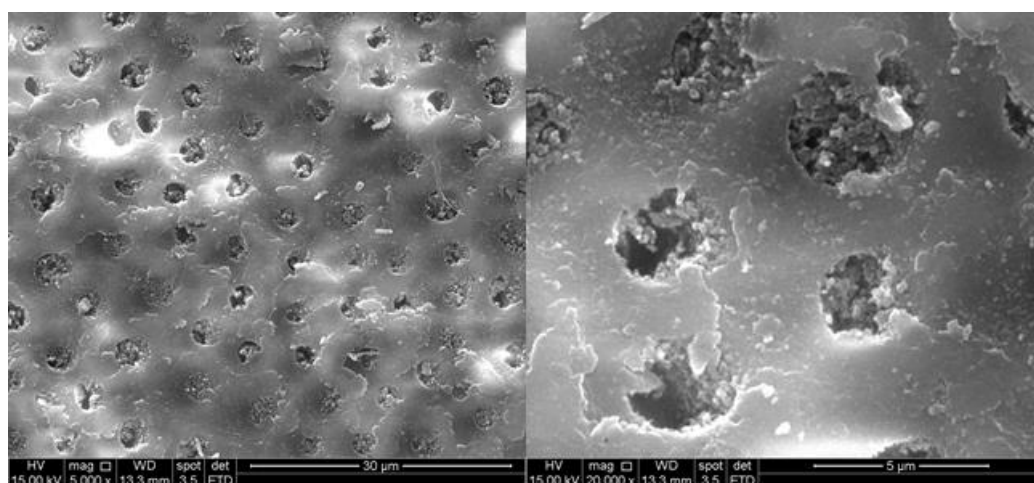


Figura 52. Imagem de MEV dos discos de dentina após 1 dia de tratamento com gel com MPVBF 9%F (Micro B).

As aplicações do gel foram repetidas diariamente e os resultados dos tempos 3, 7 e 14 dias estão apresentados nas figuras 53, 54, 55, respectivamente.

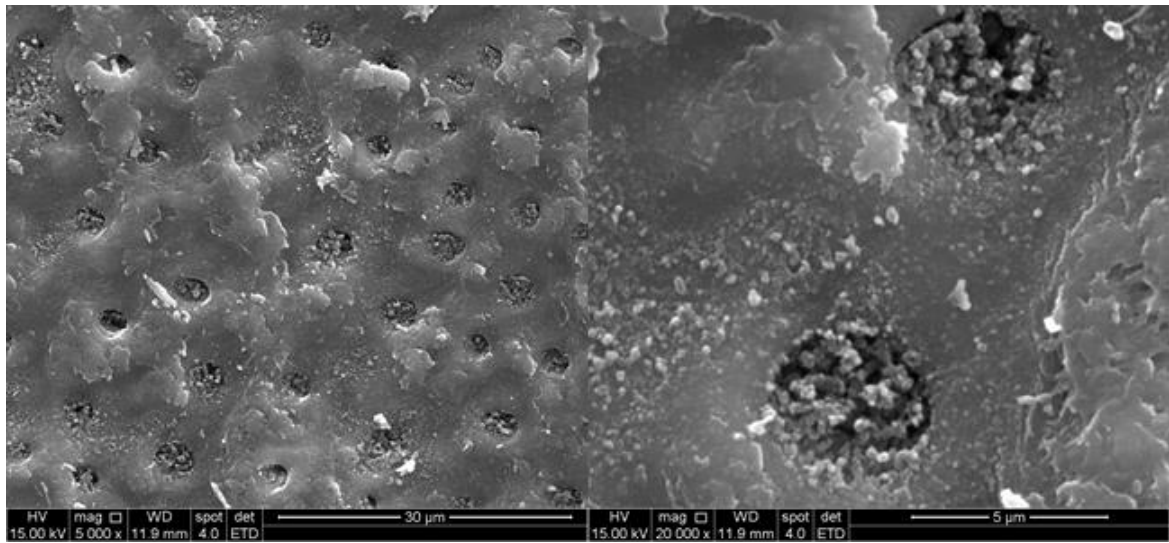


Figura 53. Imagem de MEV dos discos de dentina após 3 dias de tratamento com gel com MPVBF 9%F (Micro B).

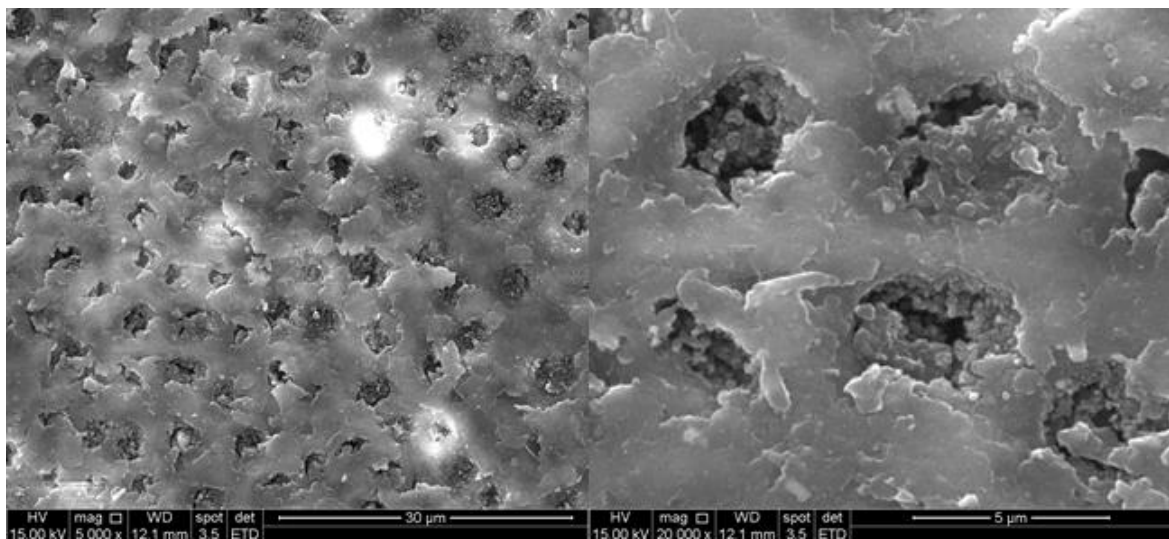


Figura 54. Imagem de MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com gel com MPVBF 9%F (Micro B).

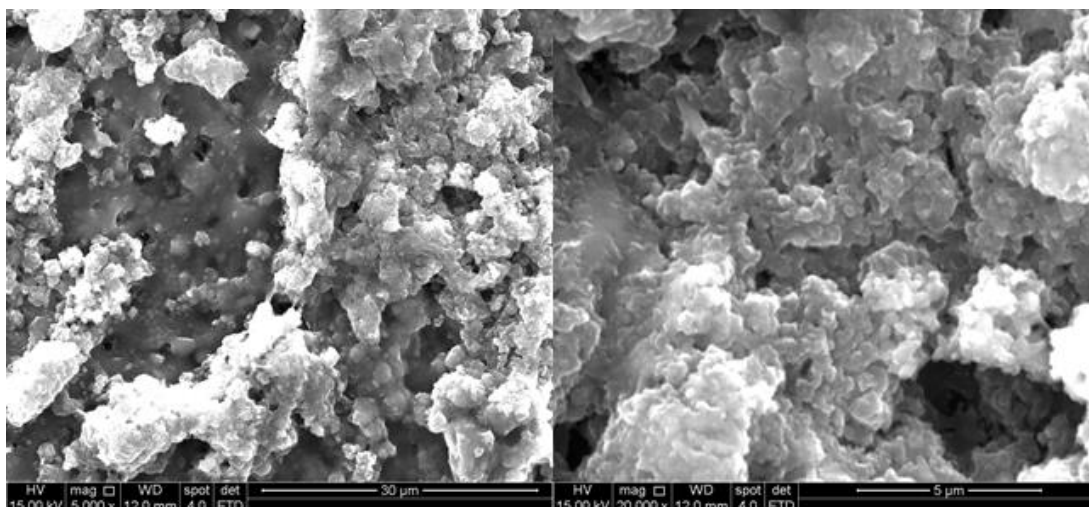


Figura 55. Imagem de MEV dos discos de dentina após 14 dias de tratamento com gel com MPVBF 9%F (Micro B).

A partir da análise das microfotografias após o tratamento com o gel com MPVBF foi possível observar a obliteração gradual dos túbulos dentinários dos discos de dentina nos intervalos de tempos avaliados.

Comparando de forma qualitativa os resultados obtidos para as NPVBF e MPVBF, pode-se inferir que ambas foram capazes de atingir o objetivo de remineralização, contudo as nanopartículas apresentaram capacidade de obliterar os túbulos de forma mais rápida e eficiente.

O flúor também não foi identificado na análise de EDS após 14 dias de aplicação do gel com MPVBF, realizada na região de obliteração dos túbulos, conforme figura 56. O demais componentes Si, Ca, P, O foram identificados.

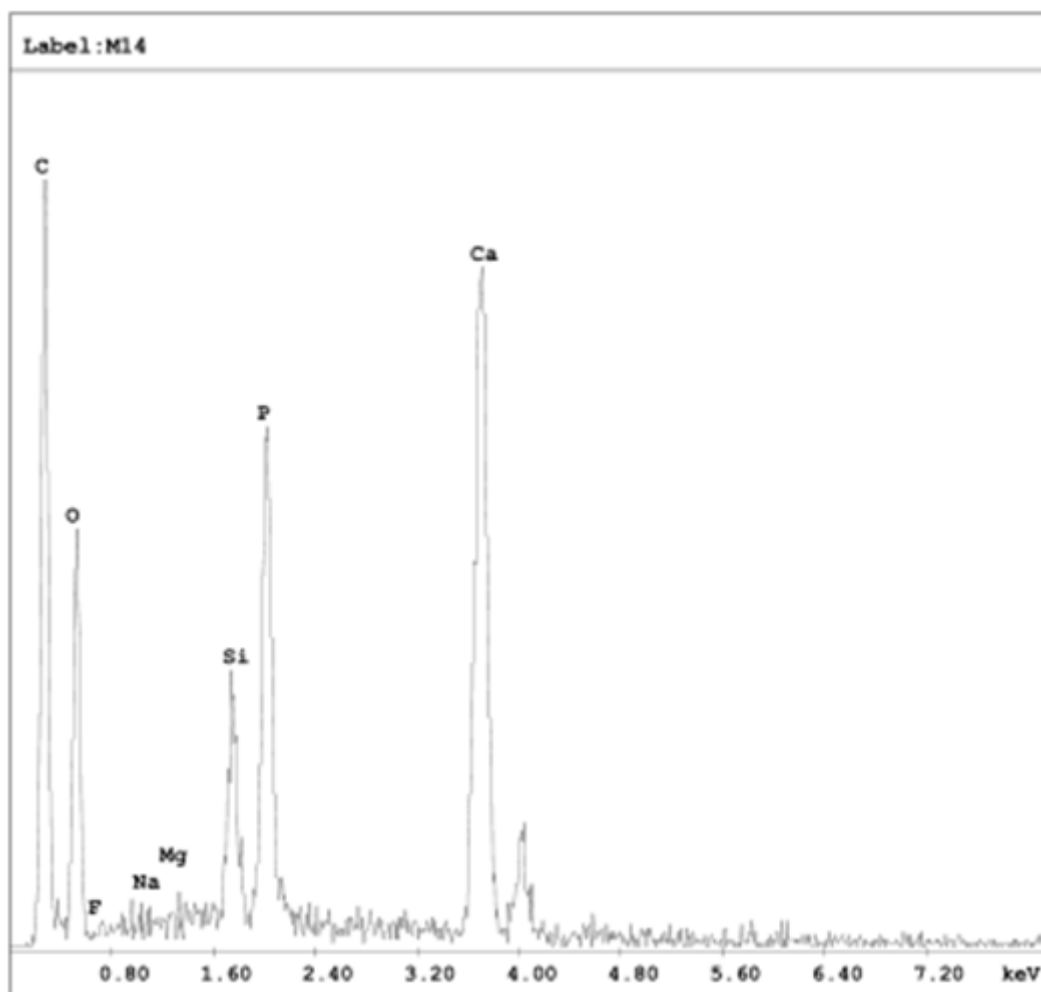


Figura 56. Análise EDS do disco de dentina após 14 dias de tratamento com gel MPVBF (Micro B)

6.3.4. Testes de comparação com produto existente no mercado

Para critério de comparação e controle dos resultados, os testes *in vitro* foram também realizados com a pasta Colgate Sensitive Pró-álvio® e Sensodyne Repair & Protect® que já estão sendo comercializadas para utilização no tratamento da HD.

As aplicações da pasta Sensodyne Repair & Protect® foram realizadas diariamente, simulando uma escovação dentária e os resultados dos tempos 1, 3, 7 e 14 dias estão apresentados nas figuras 57, 58, 59 e 60 respectivamente.

A pasta de dente Repair & Protect com tecnologia Novamin® é uma pasta de dente com 5% vidro bioativo em sua composição, que ajuda a reparar áreas vulneráveis com os componentes naturais de construção dos dentes. Segundo o fabricante, uma vez

em contato com a saliva, a fórmula Novamin® libera o cálcio e fosfato, os componentes naturais de construção dos dentes. Estes íons formam uma camada mineral protetora, que repara as áreas vulneráveis do dente.

Sob a marca Novamin® (Dentsply, EUA), o vidro bioativo está disponível em cremes dentais de uso caseiro e pasta de profilaxia em consultório. Estudos *in vitro* confirmam a partir da microscopia eletrônica de varredura e avaliação por condutância hidráulica que o vidro bioativo oclui os túbulos dentinários. Contudo, a formulação do creme dental Sensodyne Repair & Protect® demonstrou curto prazo de eficácia clínica de 6 semanas na redução da dor da HD (Shiau, 2012).

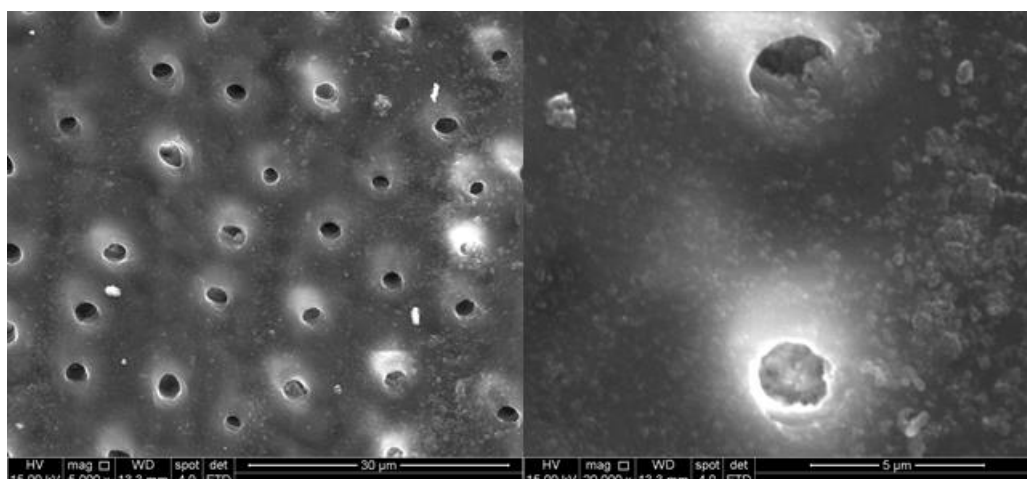


Figura 57. Imagem de MEV dos discos de dentina após 1 dia de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®

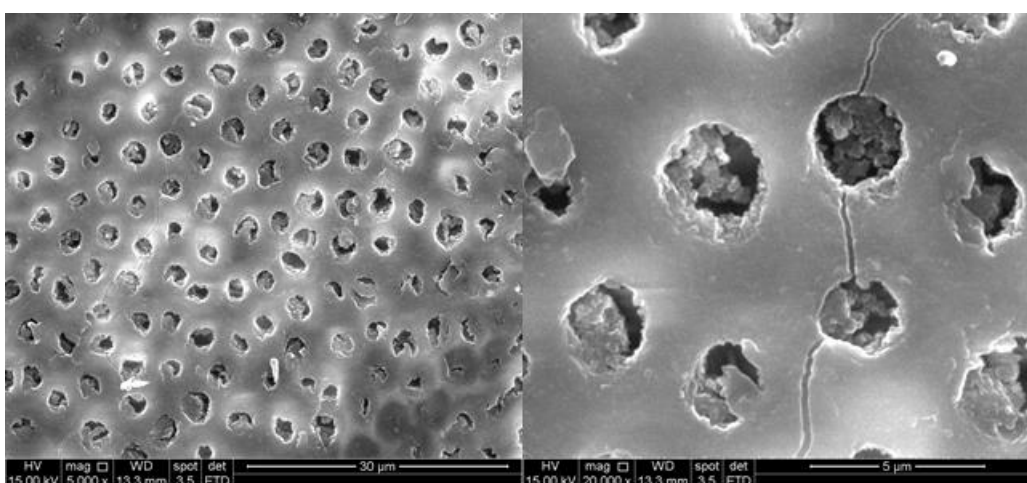


Figura 58. Imagem de MEV dos discos de dentina após 3 dias de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®

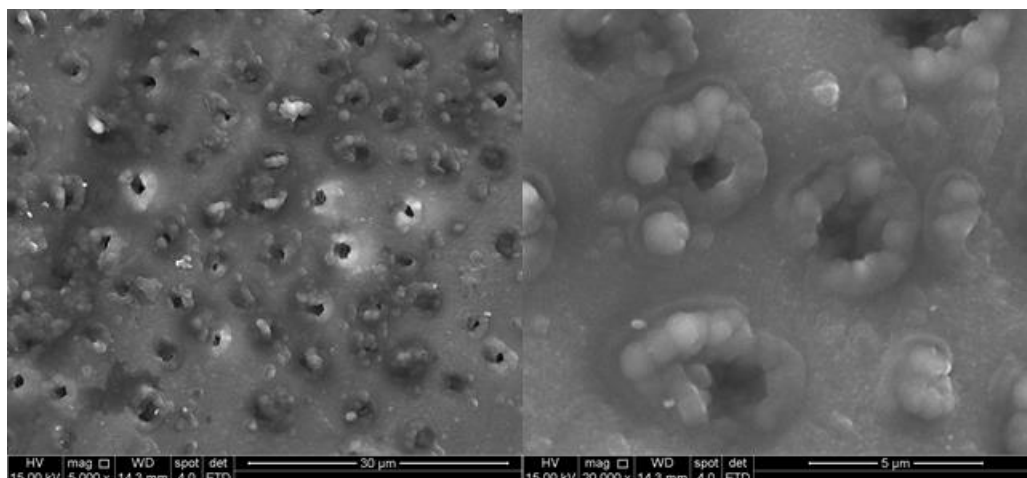


Figura 59. Imagem de MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®

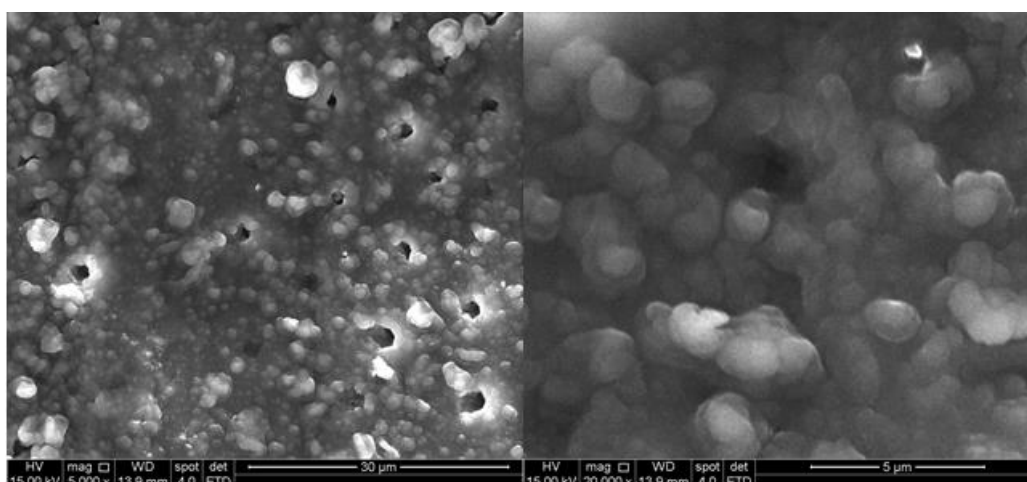


Figura 60. Imagem de MEV dos discos de dentina após 14 dias de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®

Os resultados do presente estudo mostraram que o início da oclusão dos túbulos dentinários das amostras de dentina tratadas com Sensodyne Repair & Protect® ocorreu no intervalo de 3 dias de aplicação, e aumentou nos tempos subsequentes analisados. O flúor também não foi identificado na análise de EDS após 14 dias de aplicação da pasta, realizada na região de obliteração dos túbulos, conforme figura 61. Os demais componentes, Na, Mg, Si, P e Ca, foram identificados na análise de EDS.

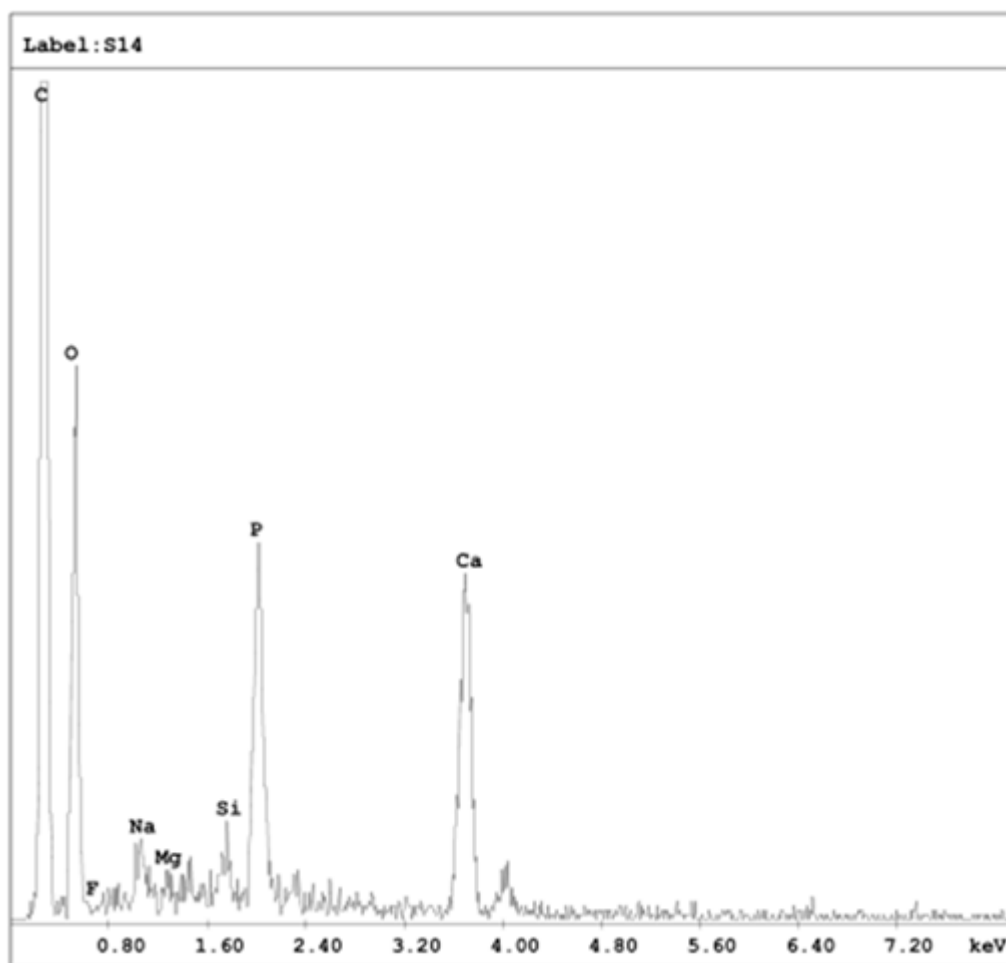


Figura 61. Análise EDS do disco de dentina após 14 dias de tratamento com a pasta Sensodyne Repair & Protect®

As aplicações da pasta Colgate Sensitive Pró-álvio® também foi realizada diariamente, simulando uma escovação dentária e os resultados dos tempos 1, 3, 7 e 14 dias estão apresentados nas figuras 62, 63, 64 e 65 respectivamente.

O dessensibilizante Colgate Sensitive Pró-Álvio possui arginina e carbonato de cálcio em sua fórmula, que segundo o fabricante são carregados positivamente em pH fisiológico, ligando-se à superfície da dentina, carregada negativamente, e ajudando a formar uma camada rica em cálcio na superfície da dentina e no interior dos túbulos dentinários, desta forma, selando-os. Ainda, segundo o fabricante, a arginina provoca a oclusão dos túbulos dentinários e esta oclusão permanece intacta mesmo depois de exposição a ácidos, evitando a transmissão dos estímulos causadores da dor.

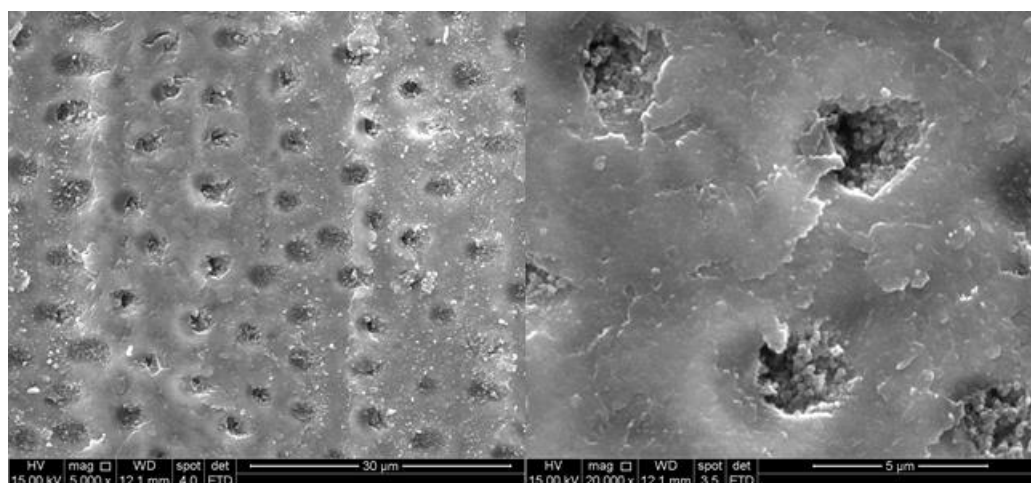


Figura 62. Imagem de MEV dos discos de dentina após 1 dia de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®

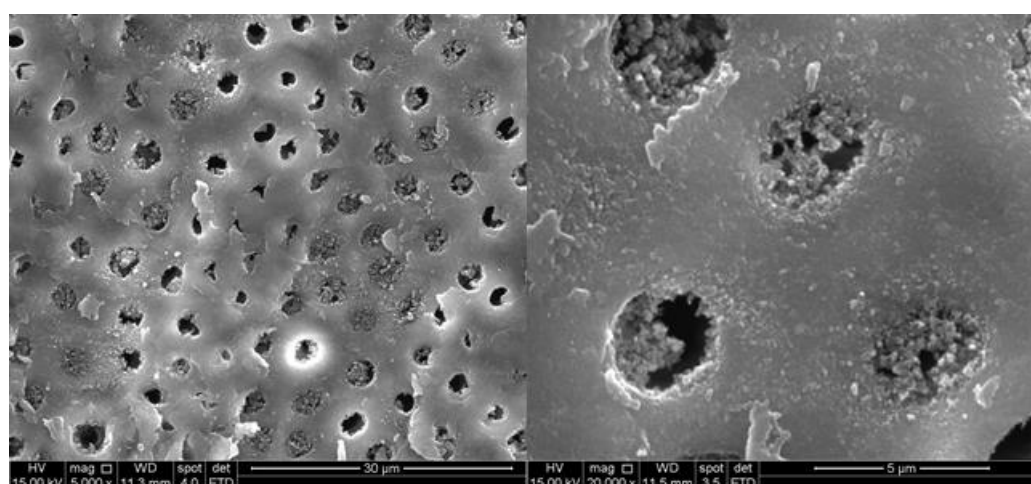


Figura 63. Imagem de MEV dos discos de dentina após 3 dias de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®

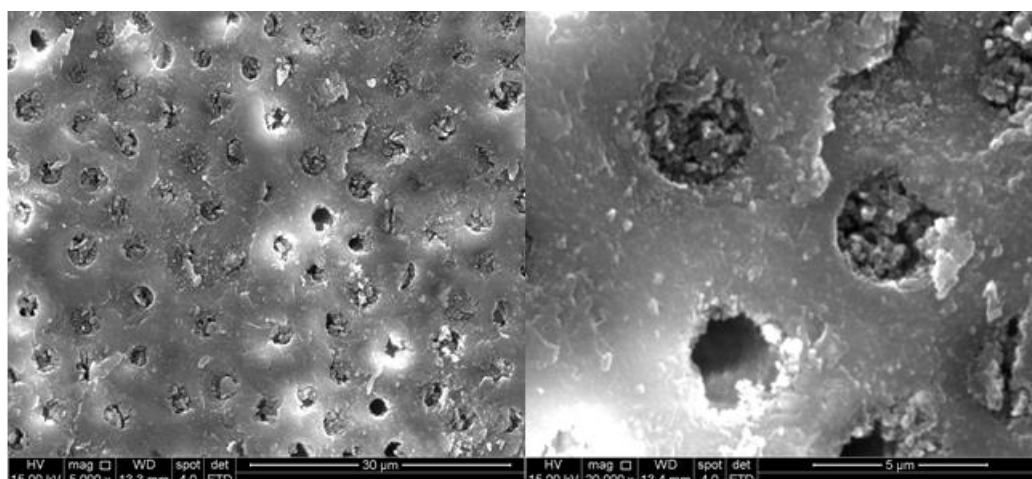


Figura 64. Imagem de MEV dos discos de dentina após 7 dias de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®

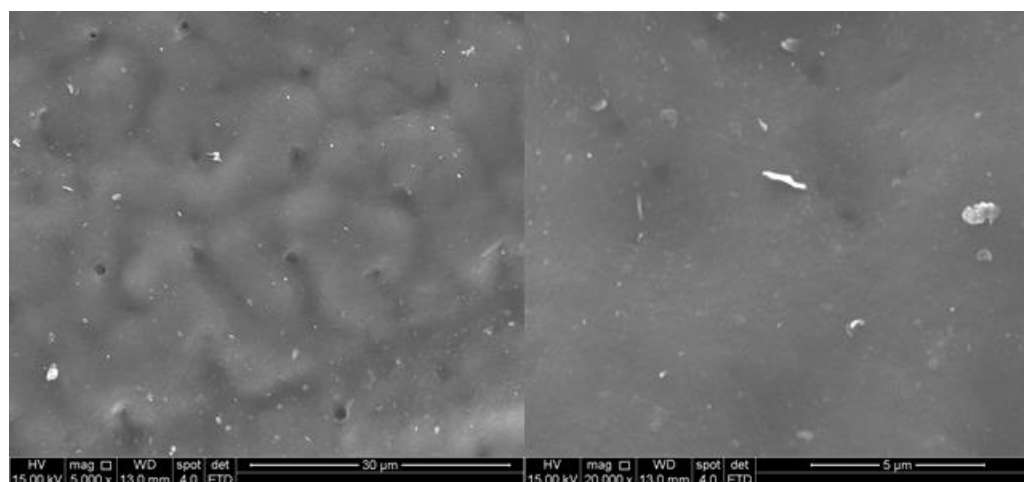


Figura 65. Imagem de MEV dos discos de dentina após 14 dias de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®

Os resultados do presente estudo mostraram que o início da oclusão dos túbulos dentinários das amostras de dentina tratadas com Colgate Sensitive Pró-alívio® ocorreu no intervalo de 1 dia de aplicação, e aumentou nos tempos subsequentes analisados.

Petrou (2009) avaliou em seu estudo a eficácia da pasta Colgate Sensitive Pró-alívio® e apresentou em seus resultados que os discos de dentina foram completamente obstruídos após cinco aplicações sem escovação ou força mecânica.

Marín (2013) concluiu em seu trabalho que avaliou a utilização pasta Colgate Sensitive Pró-alívio® em pacientes que apresentavam HD em dentes com recessão gengival, e

relatou que o produto mostrou efetividade na redução da HD, contudo apresentou redução de seu efeito em longo prazo, reduzindo a sensibilidade somente quando reaplicado, tendo sua ação diminuída com o passar do tempo.

Comparando as duas pastas utilizadas comercialmente para o tratamento da HD a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio® apresentou resultado superior a pasta Sensodyne Repair & Protect®, quando avaliado o tempo decorrido para iniciar a oclusão dos túbulos dentinários.

O flúor também não foi identificado na análise de EDS após 14 dias de aplicação da pasta, realizada na região de obliteração dos túbulos, conforme figura 66. Sendo assim, outra técnica de análise deve ser utilizada, em trabalhos futuros já que em nenhuma amostra avaliada neste trabalho o flúor foi identificado após a aplicação nos discos de dentina, para poder confirmar a formação da fluorapatita. Os demais componentes Ca, P e O foram detectados.

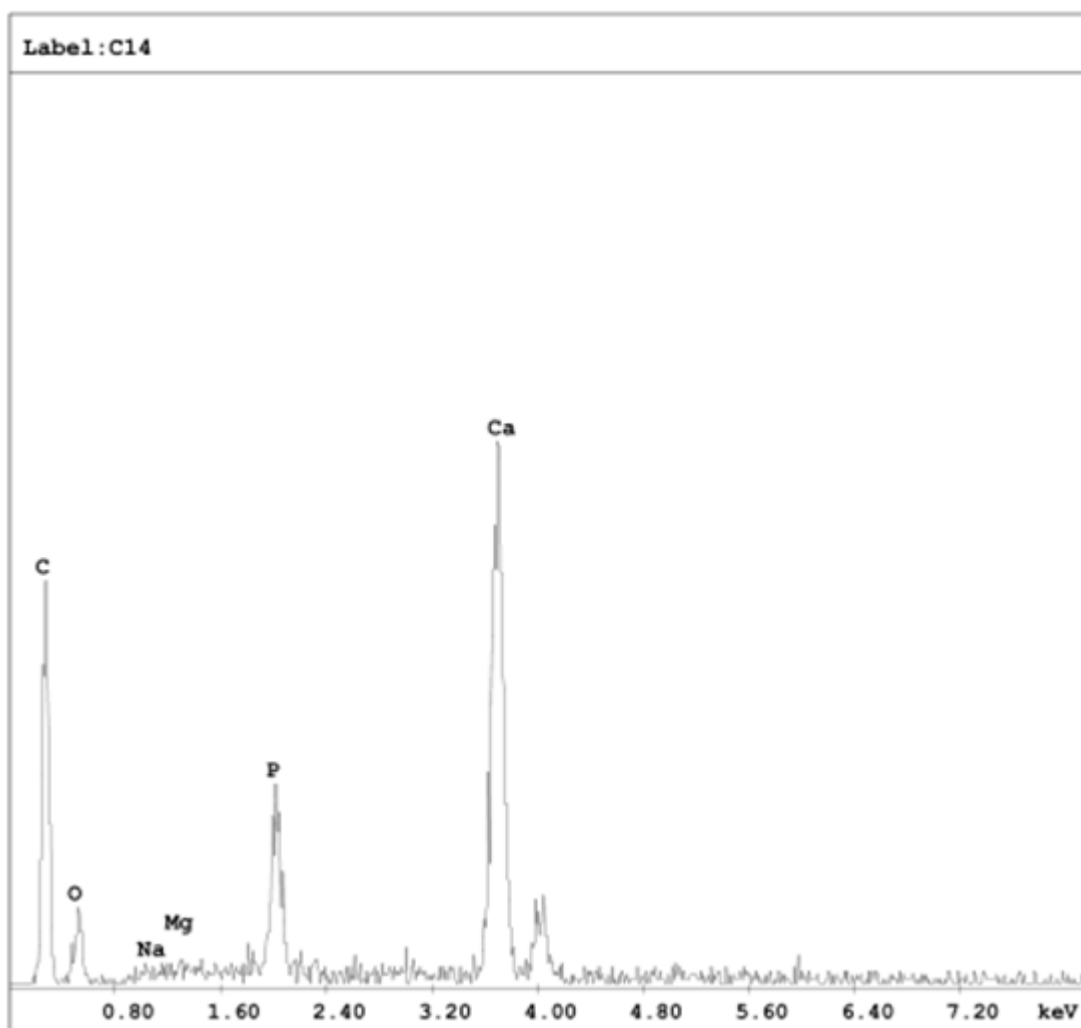


Figura 66. Análise EDS do disco de dentina após 14 dias de tratamento com a pasta Colgate Sensitive Pró-alívio®

Após avaliação dos resultados obtidos para as quatro amostras analisadas neste estudo, de forma qualitativa pelas imagens de MEV, apresentadas em conjunto na figura 67, foi possível inferir que ambas as amostras sintetizadas neste trabalho, NPVBF e MPVBF, apresentaram resultados mais eficazes quando comparadas com as pastas Colgate Sensitive Pró-alívio® e Sensodyne Repair & Protect®, pois conseguiram ocluir os tubulos dentinários em um menor tempo e de forma mais efetiva. Estudos *in vivo* são necessários para testar estes novos sistemas e avaliar o potencial de serem utilizados para o tratamento da HD.

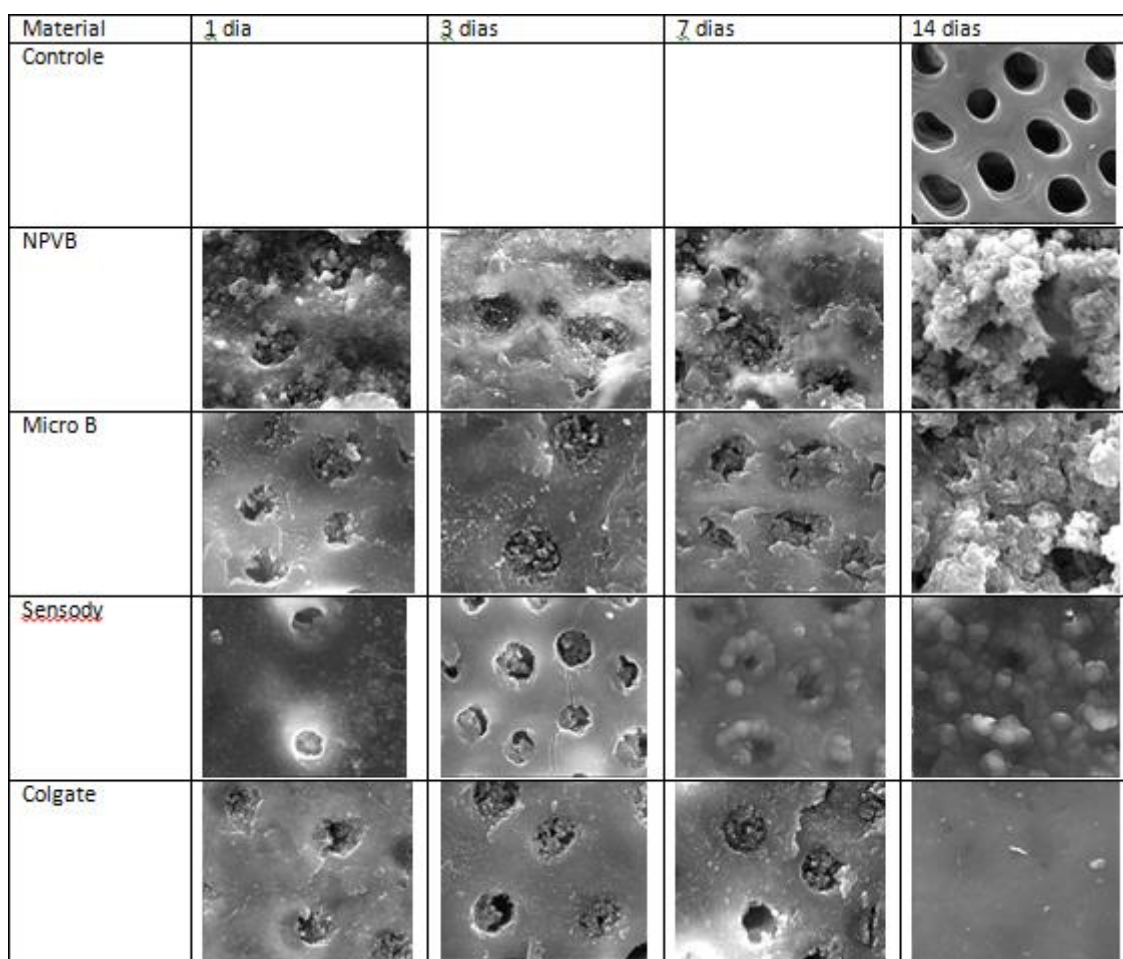


Figura 67. Imagem de MEV dos discos de dentina após tratamento com as NPVBF, MPVBF (Micro B), pasta Sensodyne Repair & Protect[®], e pasta Colgate Sensitive Pró-alívio[®], nos intervalos de tempo 1, 3, 7 e 14 dias.

6.4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidas NPVBF esféricas, obtidas pelo método de sol-gel. Os parâmetros de síntese como concentração de flúor, conectividade de rede, e temperatura de tratamento térmico foram definidos. Foram analisadas as diferenças encontradas a partir da avaliação de técnicas de caracterização FTIR, DRX, BET das NPVBF e MPVBF. A análise por EDS indicou a presença do flúor no sistema que pode resultar na formação da fluorapatita que é quimicamente mais estável do que a hidroxiapatita, apresentando assim um grande interesse para aplicações odontológicas. A utilização do vidro bioativo contendo flúor em nanoescala, como foi sintetizado neste trabalho, favorece a capacidade deste material se depositar no interior dos túbulos dentinários.

Os géis contendo as NPVBF e MPVBF foram caracterizados pelo ensaio de MTT, os resultados mostraram que os géis estudados não apresentam citotoxicidade e em algumas concentrações, ambos os géis provocaram um aumento considerável na viabilidade celular, portanto pode-se considerar que os géis apresentam potencial para serem utilizados no tratamento da HD.

Este estudo relatou resultados de experimentos que foram realizados para sintetizar e caracterizar as NPVBF, com o objetivo de definir o mecanismo pelo qual o flúor interage na rede do vidro. Considerando os resultados obtidos pelas análises de DRX e XPS e os resultados obtidos relatados na literatura, sugere-se que ocorreu a formação de cristais de fluorapatita incorporados no interior da matriz do vidro bioativo quando realizada a síntese com ultrassom de nano e micropartículas contendo flúor pela rota sol gel. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar e definir melhor a estrutura desses materiais.

Foram realizados testes com discos de dentina para avaliar a obliteração dos túbulos dentinários *in vitro*, os resultados mostraram que as amostras sintetizadas neste trabalho, NPVBF e MPVBF, ocluíram os túbulos no intervalo de 1 dia, e apresentaram resultados mais eficazes quando comparadas com as pastas Colgate Sensitive Pró-alívio® e Sensodyne Repair & Protect®.

Os resultados deste estudo indicam que a NPVBF sintetizada neste estudo é um material com potencial para ser incorporado em pastas dentais dessensibilizantes, para melhorar o tratamento da HD. Contudo, estudos *in vivo* também serão necessários para demonstrar se os promissores resultados dos estudos *in vitro* podem ser aplicados para a obtenção de benefícios clínicos.

7. CONCLUSÕES FINAIS

A partir da avaliação dos resultados das três etapas realizadas é possível concluir que as micropartículas e as nanopartículas de vidro bioativo com e sem flúor apresentaram resultados importantes para o tratamento da HD. Os melhores resultados foram encontrados para as nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor, as quais foram o foco principal do presente estudo. A partir dos resultados das técnicas de análise utilizadas sugere-se que ocorreu a formação de cristais de fluorapatita incorporados no interior da matriz do vidro bioativo das NPVBF. O gel contendo NPVBF testado não apresentou citotoxicidade e foi eficaz em obliterar os túbulos dentinários *in vitro*, atingindo este resultado após um dia de aplicação, apresentando resultados superiores ao das pastas já comercializadas. Sendo assim, é possível concluir que este novo sistema contendo NPVBF é um material com potencial para ser utilizado para melhorar o tratamento da HD.

8. CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO

- Neste trabalho foi sintetizado um novo sistema com potencial para ser utilizado no tratamento da HD. Foram produzidas nanopartículas de vidro bioativo, esféricas, contendo flúor, obtidas pelo método sol-gel;
- Foi avaliada a interação do flúor com a rede do vidro bioativo e proposto o modelo de formação de cristais de fluorapatita incorporados no interior da matriz do vidro bioativo quando realizada a síntese com ultrassom de nano e micropartículas contendo flúor pela rota sol-gel. A formação da fluorapatita que é quimicamente mais estável do que a hidroxiapatita apresenta um grande interesse para aplicações odontológicas;
- O gel contendo NPVBF produzido mostrou ser compatível e induzir o aumento da viabilidade celular;
- A avaliação da oclusão dos túbulos dentinários *in vitro* mostrou que o gel contendo NPVBF apresentou resultados mais eficazes que as pastas testadas já comercializadas.

9. RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS

A prevalência de HD aumenta com a idade e o aumento no nível de dentina exposta por recessão gengival devido a um aumento no nível de erosão dentária (dissolução ácida por dieta, associada com as melhorias nas práticas de higiene oral), indicando que a prevalência de HD apresenta a tendência de aumentar ainda mais no futuro. Como a ingestão de alimentos e bebidas com potencial erosivo afeta a superfície do dente e, posteriormente, pode levar ao desenvolvimento da HD, tem sido sugerido que o pico de idade para HD (atualmente entre a terceira e quarta décadas) pode mudar para um grupo etário mais jovem. Além disso, as populações parecem estar mantendo seus dentes por mais tempo na vida, e um aumento na dentina radicular exposta, quer devido à práticas de higiene oral ou terapia periodontal repetida, pode também levar a um aumento na prevalência da HD. Isto indica claramente uma necessidade de novos métodos eficazes de tratamento e prevenção da HD. Há uma crescente necessidade clínica para o surgimento de novos materiais odontológicos com capacidade remineralizadora. O uso de cremes dentais contendo NPVBF é promissor, pois eles podem formar FAP e ocluir túbulos dentinários expostos, além de liberar terapeuticamente íons ativos, tais como o flúor sobre a superfície de dentina exposta, com potencial para remineralizar lesões de cárie.

10. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realização de testes *in vitro* para verificar a resistência a ácidos do material depositado no interior dos túbulos. Este teste determinará se os túbulos dentinários permanecerão obstruídos após a exposição a bebidas ácidas;
- Realização da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear do sólido para confirmar a presença da fluorapatita no interior dos túbulos dentinários obstruídos dos discos de dentina;
- Realização de experimentos que analisem a condutividade hidráulica no interior dos túbulos para avaliar a inibição do movimento do fluido no interior dos túbulos após a obliteração;
- Realização de mais estudos para melhorar as condições de síntese do sistema, para obter um sistema nanoparticulado que não aglomera ou sinteriza após tratamento térmico;

11. ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do comitê de ética em pesquisa - COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE - 27701914.9.0000.5149

Interessado(a): Profa. Marivalda de Magalhães Pereira
Departamento de Engenharia Metalúrgica e
 Materiais
Escola de Engenharia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 30 de abril de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Síntese e caracterização de nanopartículas de vidro bioativo contendo flúor e avaliação in vitro do potencial para aplicação no tratamento da hipersensibilidade dentinária**".

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Absi, E. G., Addy M, Adams D. Dentine Hipersensitivity: uptake of toothpastes onto dentine and effects of brushing, washing and dietary acid – SEM *in vitro* study. *J Oral Rehabil.* 22(3):175-82, mar. 1995.

Aguiar, F.H.B., Giovanni EM, Monteiro FHL, Villalba H, Melo JJ de, Tortamano N. Hipersensibilidade dentinária – causas e tratamento. Uma revisão de literatura. *Rev Inst Cienc Saude;* 23(1): 67-71, 2005.

Ahmed, T.R., Mordan NJ, Gilthorpe MS, Gillam DG. *In vitro* quantification of changes in human dentine tubule parameters using SEM and digital analysis. *J Oral Rehabil.* 32:589-97, 2005.

Ahamed, S.; Deepa, V.K.; Meyappan, R.; Narayana S.S.; Kumar, K.S.S.; Sathish, E.S. Remineralization efficiency of bioactive glass on artificially induced carious lesion an *in-vitro* study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, Vol. 32, No. 1, January-Marc, pp. 19-25, 2014.

Almeida, E.C.B de; Menezes MR de M.; Aguiar CM. Tratamento da hiperestesia dentinaria com laser de GaAIIAs. *Odontologia. Clin.- Cientif* 2006; 5(2): 143-152.

Aranha, A.C.C; Marchi GM. Hipersensibilidade dentinaria: Aspectos Gerais e Tratamento. *Jornal Brasileiro de Clinica Odontologica Integrada;* 8(44): 179 - 184, 2004.

Arrais, C. A; Micheloni CD, Giannini M, Chan DC. Occluding effect of dentifrices on dentinal tubules. *J Dent.;* 31:577-84, 2003.

Arrais, C. A; Chan DCN, Giannini M, et al. Effects of desensitizing agents on dentinal tubule occlusion. *J Appl Oral Sci.;* 12:144-48, 2004.

Barbosa, R.P; de S, Santos RL dos, Gusmao ES. Terapias para controle de lesões não cáries hipersensíveis. *Odontologia. Clin. – Cientif* 2005; 4 (3): 171-176, 2005.

Bogdanov, B.I.; Pashev, P.S.; Hristov, J.H.; Markovska I.G. Bioactive fluorapatite-containing glass ceramics. *Ceramics International* 35, 1651–1655.

Bosshardt, D.D.; Sculean A, Windisch P, Pjetursson BE, Lang NP. Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth. *J Periodontal Res*; 40: 158-167, 2005.

Bramante, A.S.; Vale IS. Hipersensibilidade dentinária: Etiologia e Mecanismo de Ação. *Rev FOB*. 4(1/2): 67-70, 1996.

Brännström, M.; Anderson, D. J. Em Sensory mechanisms in dentine: proceedings of a symposium. Ed.; London, England, 1962, Pergamon: Oxford, p. 73; 1963.

Brännström, M.; Linden LA, Astrom A. et al., The hydrodynamics of the dental tubule and of pulp fluid. A discussion of its significance in relation to dentinal sensitivity. *Caries Res.*; 1:310-17, 1967.

Brännström, M.; Aström A. The hydrodynamics of the dentine, its possible relationship to dentinal pain. *Int Dent J.*; 22(1):219-27, 1972.

Brännström, M.; Etiology of dentin hypersensitivity. *Proc Fin Dent Soc.*; 88(suppl):7-13; 1992.

Brauer, D.S.; Karpukhin, N; O'Donnell, MD; Law, RV; Hill, RG. Fluoride-containing bioactive glasses: Effect of glass design and structure on degradation, pH and apatite formation in simulated body fluid. *Acta Biomaterialia* 6, 3275–3282, 2010.

Brauer, D.S.; Al-Noamana, A.; Hill, RG.; Doweidarb, H. Density–structure correlations in fluoride-containing bioactive glasses. *Materials Chemistry and Physics* 130, 121– 125, 2011.

Brauer, D.S.; Anjum, M.N.; Mneimne, M.; Wilson R.M.; Doweidar, H.; Hill R. G.; Fluoride-containing bioactive glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids* 358 1438–1442, 2012.

Brinker, C. J.; Scherer, G. W.: Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. *Academic Press, Inc.*, London, p.908, 1990.

Camps, J.; Pashley D. In Vivo sensitivity of human root dentin to airblast and scratching. *J Periodontol.* nov;74(11):1589-94, 2003.

Cheng, K.; Zhang, S.; Weng, W. The F content in sol–gel derived FHA coatings: an XPS study. *Surface & Coatings Technology* 198, 237– 241, 2005.

Chow, L.C.; Vogel G.L., *Operative Dent.* 6, 27, 2001.

Chu, C-H.; Lo, E. C-M.; *Hong Kong Dent. J.*, 7, 15, 2010.

Coleman, T. A.; Grippo JO, Kinderknecht KE. Cervical dentin hypersensitivity. Part II: Associations with abfraction lesions. *Restorative Dent.*; 31(7):466-73, 2000.

Collaert, B.; Fischer C. Dentine hypersensitivity: a review. *Endod dent Traumat.* 7(4):145-52, aug. 1991.

Conceição, E.M.; *Dentística: Saude e Estetica.* Porto Alegre: Editora Artmed; 2 ed. 2007.

Corona, S. M. A.; Nascimento TN do, Catirse ABE, Lizarelle RFZ, Dinelli W, Palma-Dibb RG. Clinical evaluation of low-level laser therapy and fluoride varnish for treating cervical dentinal hypersensitivity. *J. Oral Rehabil*; 30: 1183-1189, 2003.

Costa, A.C.; Splett D, Beltrao MCG. Sensibilidade dentinaria associada as restauracoes de resinas compostas. *Revista Odonto Ciencia – Fac. Odonto/PUCRS*; 18(40), 2003.

Costa, A. C. F. M.; Lima, M. G.; Lima, L. H. M. A; Cordeiro, V.V.; Viana, K.; Souza, S. V.; Lira, H.L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.4.3, 2009).

Cummins, D. Dentin hypersensitivity: from diagnosis to a breakthrough therapy for everyday sensitivity relief. *J Clin Dent*; 20(1):1–9, 2009.

Davis, H. B.; Gwinner, F.; Mitchell, J.C.; Ferracane J.L. Ion release from, and fluoride recharge of a composite with a fluoride-containing bioactive glass. *Dental Materials* 30, 1187–1194, 2014.

Dourda, A.O.; Moule AJ, Young WG. A morphometric analysis of the cross-sectional area of dentine occupied by dentinal tubules in human third molar teeth. *Int Endod J*; 27:184-189, 1994.

Dourado, E.R. Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio. Dissertação de Mestrado. Centro brasileiro de pesquisas físicas. Rio de Janeiro, 2006.

Du, M.Q.; Bian Z, Jiang H, Greenspan DC, Burwell AK, Zhong JP, et al. Clinical evaluation of a dentifrice containing calcium sodium phosphosilicate (NovaMin) for the treatment of dentin hypersensitivity. *Am J Dent*;21:210–4, 2008.

Garberoglio, R.; Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archs Oral Biol.*; 21:355-62, 1976.

Garone, N.N.; Eduardo C de P, Youssef MN, Vieira GF, Carvalho RCR de, Russo EA, Sobral MAP, Luz MAAC, Cara AA de, Azevedo LH, Cardoso M V, Agra CM, Merlin RYA, Andrade AP de, Freitas ACP de, Almeida J. Adesividade em dentística. In: Busato ALS. *Dentística: Filosofia, Conceitos e Prática Clínica - Grupo Brasileiro de Professores de Dentística*. São Paulo: Artes Medicas. 2005.

Gedanken, Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials, *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 11, p. 47-55, 2004.

Gentleman, E.; Stevens M.M.; Hill R.G.; Brauer D. S. Surface properties and ion release from fluoride-containing bioactive glasses promote osteoblast differentiation and mineralization *in vitro*. *Acta Biomaterialia*, 5771–5779, 2013.

Gillam, D.G, Aris A, Bulman JS, Newman HN, Ley F. Dentine hypersensitivity in subjects recruited for clinical trials: clinical evaluation, prevalence and intra-oral distribution. *J Oral Rehabil.*; 29:226-31, 2002.

Hench, L.L. Bioactive ceramics. *Ann N Y Acad Sci*; 523: 54-71, 1988.

Hench, L.L. Bioceramics and the origin of life. *J Biomed Mater Res*; 23: 685-703, 1989.

Hench, L.L. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*; 17: 967-978, 2006.

Mneimne, M.; Bushby, AJ; Brauer, DS; Hill, RG. High phosphate content significantly increases apatite formation of fluoride-containing bioactive glasses. *Acta Biomaterialia*, 1827–183, 2011.

Hotta, T.H.; Marchesan JT, Santos TM dos, Silva Mamr da, Silva, R. S. da; Pecora, J. D. Uso de Laser e Placa Oclusal na Sensibilidade Dentinaria de Bruxomeros. *RGO*; 54(2): 195-198, 2006.

Kleinberg, I. SensiStat. A new saliva-based composition for simple and effective treatment of dentinal sensitivity pain. *Dent Today*; 21(12):42–7, 2002.

Kokubo, T.; *Bioceramics and their clinical applications*, CRC Press: Boca Raton, 2008.

Kumar, M.N.V.R.; Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, v.104, n.12, p.6017-6084, 2004.

Labbaf, S.; Tsigkou O.; Müller K. H.; M. M. Stevens, Porter A. E.; Jones J. R. Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Biomaterials* 32, 1010-1018, 2011.

Langer, R.; Tissue engineering, *Molecular Therapy*, 1, 12-15, 2000.

Liu, H.; Webster, T. J. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* 28 354–69, 2007.

Lusvardi, G.; Malavasi G., Menabue L., Aina V., Morterra C. Fluoride-containing bioactive glasses: Surface reactivity in simulated body fluids solutions. *Acta Biomaterialia* 5, 3548–3562, 2009.

Lynch, E.; Brauerb, D.; Karpukhinab, N.; Gillama, D. G.; Hill, R. G. Multi-component bioactive glasses of varying fluoride content for treating dentin hypersensitivity, *Dental Materials* 28, 168–178, 2011.

Marín, C.; Bottan, E. R.; Degobi, B. L.; Magnani, N. Effectiveness of two desensitizing pastes in the control of dentin hypersensitivity in patients with gingival recession. *Odonto*, 21(41-42): 47-54, 2013.

Marshall Jr, G.W.; Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 25:441-58, 1997.

Mitchell, J. C.; Musanje L; Ferracane, JL. Biomimetic dentin desensitizer based on nano-structured bioactive glass. *Dental materials* 27 386–393 2011.

Nakajima, T.; Tressaud, Alain; Zemva, Boris. Advanced Inorganic Fluorides: Synthesis; Characterization and Applications. Editora Elsevier Science S.A. USA, 2000.

Nourmohammadi, J.; Sadrnezhaad SK, Ghader AB. Bone-like apatite formation on the new resin-modified glass-ionomer cement. *J Mater Sci Mater Med*;19:3507–14, 2008.

Oberg, C.; Coutinho PG, Pochapski MT, Pilatti GL, Santos FA. Análise do potencial de substâncias dessensibilizantes na obliteração de túbulos dentinários. Estudo *in vitro*. *Rev de Periodontia*. 16(2):76-82, jun 2006.

Ohgushi, H.; Caplan A.I. Stem Cell Technology and Bioceramics: From cell to Gene Engineering, *J. Biomed. Mater. Res.*, 48, 913-927., 1999.

Oliveira, A.A.R.; Carvalho, AS; Leite, MF; Orefice, RL; Pereira, MM. Development of biodegradable polyurethane and bioactive glass nanoparticles scaffolds for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res Part B:100B:1387–1396.*, 2012.

Oliveira, A.A.R.; Souza, D.A.; Dias, L.L.S.; Carvalho, S.M.; Mansur, H.S.; Pereira, M. M. Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. *Biomed. Mater.* 8, 2013.

Oliveira, A.A.R.; Carvalho, B.B.; Mansur, H. S.; Pereira, M.M. Synthesis and Characterization of Bioactive Glass Particles using an Ultrasoundassisted Sol-Gel process: Engineering the Morphology and Size of Sonogels via a Poly(ethylene glycol) Dispersing Agent. *Materials Letters* 10/; 133(133):44-48, 2014.

Orchardson, R.; Gillam, D. G.; *J. Am. Dent. Assoc.*, 137, 990, 2006.

Ostomel; T. A., Shi Q, Tsung CK, Liang H, Stucky GD., Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity. *Small.* 11 1261-5, 2006.

Padilla, S.; Roman,J.;Sanch´ez-Salcedo,Sallet-Reg,M. Hydroxyapatite/SiO₂ CaO–P₂O₅ glass materials: *in vitro* bioactivity and biocompatibility. *Acta Biomater.* 2 331–42, 2006.

Palma, A.B.O.; Costa S de M, Resende VLS, Neves AD, Abreu MHNG de, Guedes CAS, Mourao FR, Palma ISB, Santos Neto W. Prevalencia da hipersensibilidade dentinaria cervical nos pacientes da clinica integrada I da UNIMONTES – Montes Claros/ MG. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 5(1): 29-34, 2005.

Panagakos, F., Schiff T, Guignon A. Dentin hypersensitivity: effective treatment with an in-office desensitizing paste containing 8% arginine and calcium carbonate. *Am J Dent*, 22 (Spec No A):3A–7A, 2009.

Pashley, D.H.; Dentin permeability and dentin sensitivity. *Proc Finn Dent Soc*. 88:31-37, 1992.

Pereira, M.M.; Clark AE, Hench LL. Calcium phosphate formation on sol-gel derived bioactive glasses *in vitro*. *J Biomed Mater Res*, 28: 693-698, 1994.

Pereira, M.M.; Jones JR, Orefice RL, Hench LL. Preparation of bioactive glasspolyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *J Mater Sci Mater Med*; 16: 1045-1050, 2005.

Perez, C.R.; Sergio PP, Silva FF. Avaliação clínica de um novo dessensibilizante dentinário. *RBO*, 60(2) 2003.

Petrou, I.; Heu R, Stanick M, et al. A breakthrough therapy for dentin hypersensitivity: how dental products containing 8% arginine and calcium carbonate work to deliver effective relief of sensitive teeth. *J Clin Dent* ; 20(1):23–31, 2009.

Pradeep, A.R.; Sharma A. Comparison of clinical efficacy of a dentifrice containing calcium sodium phosphosilicate to a dentifrice containing potassium nitrate and to a placebo on dentinal hypersensitivity: a randomized clinical trial. *J Periodontol*; 81(8):1167–73, 2010.

Pritsos, E.; Kontonasaki, X. Chatzistavrou, L. Papadopoulou, F. Pappas, P. Koidis, K.M.; Paraskevopoulos. Studying morphological characteristics of thermally treated bioactive glass ceramic using image analysis. *J. Eur, Ceram. Soc* 25, 2005.

Reed, J.S.; Principles of Ceramic Processing. John Wiley e Sons, New York, 1994.

Rees, J.S.; Addy M. A cross-sectional study of dentine hypersensitivity. *J Clin Periodontol.*; 29:997-1003, 2002.

Rico, A.J.; Hipersensibilidad dentinal. *Acta Clin Odontol*, v.15, n.28, p.17-29, jul./dic. 1992.

Ritter, A.V.; de L Dias W, Miguez P, Caplan DJ, Swift Junior EJ. Treating cervical dentin hypersensitivity with fluoride varnish: a randomized clinical study. *J Am Dent Assoc.*; 137:1013-20, 2006.

Roriz, V.M.; Rosa AL, Peitl O, Zanoto ED, Panzeri H, De Oliveira PT. Efficacy of a bioactive glass–ceramic (Biosilicates) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*. v. 21. p.148-55. 2010.

Santos, R.L.; Gusmao ES, Caldas Junior A de F, Silveira RCJ. Uso do etil-cianoacrilato e Prime & Bond 2.1 em dentes hipersensíveis pós-terapia periodontal. *RBO*; 60(1), 2003.

Shapoff, C.; Alexander D., Clark A. Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. *Compend Contin Educ Dent*. 18(4):352-8, 1997.

Schilke, R.; Lisson JA, Baub O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Archs Oral Biol*. 45:355-61, 2000.

Silva, C.H.V.; Souza FB de, Guimaraes RP, Lyra AMV de C, Loretto SC, Braz R, Cabral AJ, Beatrice LC de S, Correia M das N. Diagnostico e plano de tratamento. In: Busato ALS. *Dentistica: Filosofia, Conceitos e Pratica Clinica* - Grupo Brasileiro de Professores de Dentistica. Sao Paulo: Artes Medicas. 2005. p. 95 -124.

Silva, G.R.; Cunha Jr. A.S.; Behar-Cohen, F.; Ayres, E.; Oréface, R.L. Biodegradation of polyurethanes and nanocomposites to noncytotoxic degradation products. *Polymer Degradation and Stability*. 95, 491-499, 2010.

Siqueira, R.L.; Zanotto, E. D. Biosilicate®: historical of a highly bioactive brazilian glass-ceramic. *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 7, 1231-1241, 2011.

Shiau, H.J.; Dentin Hypersensitivity. *J Evid Base Dent Pract.*[220-228], 2012.

Sobral, M.A.P.; Lesoes cervicais nao cariosas e hipersensibilidade dentinaria cervical. In: Garone Netto N et al. *Introducao a Dentistica Restauradora*. São Paulo: Santos. p. 265-283, 2003.

Sowinski, J.; Ayad F, Petrone M, DeVizio W, Volpe A, Ellwood R, Davies R. Comparative investigations of the desensitizing efficacy of new dentifrice. *J Clin Periodontol.* ; 28:1032-38, 2001.

Stead, W.J.; Orchardson R, Warren PB. A mathematical model of potassium ion diffusion in dentinal tubules. *Arch Oral Biol*; 41(7):679-687, 1996.

Suge, T.; Ishikawa K, Kawasaki A, Yoshiyama M, Asaoka K, Ebisu S. Duration of dentinal tubule occlusion formed by calcium phosphate precipitation method: *in vitro* evaluation using synthetic saliva. *J Dent Res*. 74(10):1709-14, 1995.

Tirapelli, C.; Panzeri H, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. *Braz Oral Res*, Oct-Dec;24(4):381-7, 2010.

Thuy, T.T.; Nakagaki H, Kato K, Phan AH, Inukai J, Tsuboi S, Nakagaki H, et al. Effect of strontium in combination with fluoride on enamel remineralization *in vitro*. *Arch Oral Biol*; 53:1017–22, 2008.

Tonetto, M.R.; Dantas, AAR.; Bortolini, GF.; Dentin hypersensitivity: in search of an effective treatment. *Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo*; 24(3): 190-9, setembro, 2012.

Trushkowsky, R.D.; Oquendo, A; Treatment of Dentin Hypersensitivity. *Dent Clin N Am* 55, 599–608, 2011.

Verma, L. Y.; Singh, P.M.; Singh, R. K. Effect of irradiation ultrasonic to sonogels prepare. *J. Nanomat*, 2012.

Wara-aswapati, N.; Krongnawakul D, Jiraviboon D, Adulyanon S, Karimbux N, Pitiphat W. The effect of a new toothpaste containing potassium nitrate and triclosan on ginigval health, plaque formation and dentine hypersensitivity. *J Clin Periodontol*; 32:53-58, 2005.

Weeb, P.A.; ORR C. Analytical methods in fine particle technology. *Micromeritics Instrument Corp*, 1997.

Webster, T.J.; Ergun, C; Doremus, RH; Siegel,RW; Bizios,R. Nanoceramic surface roughness enhances osteoblast and osteoclast functions for improved orthopaedic/dental implant efficacy j. *Biomed. Mater. Res.* 51, 475.1261, 2000.

Wefel, J.S.; NovaMin: Likely clinical success. *Adv Dent Res* ;21:40-3, 2009.