

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAIBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

SÍDNEI NAHÓRNY

**BIOMINERALIZAÇÃO INDUZIDA POR QUITOSANA E MATERIAIS À BASE DE
COLÁGENO COM FLÚOR PARA COBERTURA DE DENTINA RADICULAR
SUBMETIDA À EROSÃO**

SÃO JOSE DOS CAMPOS, SP

2022

Sídnei Nahórny

**BIOMINERALIZAÇÃO INDUZIDA POR QUITOSANA E MATERIAIS À BASE DE
COLÁGENO COM FLÚOR PARA COBERTURA DE DENTINA RADICULAR
SUBMETIDA À EROSÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Biomédica, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Engenharia
Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Silva Soares.
Co-orientadora: Profa. Dra. Ivone Regina de
Oliveira.

São José dos Campos, SP
2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Nahórny, Sídnei

Biomíneralização induzida por quitosana e materiais à base de colágeno com flúor para cobertura de dentina radicular submetida à erosão / Sídnei Nahórny; orientador, Luís Eduardo Silva Soares; co-orientadora Ivone Regina de Oliveira. - São José dos Campos, SP, 2022.

79 p.

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

Inclui referências

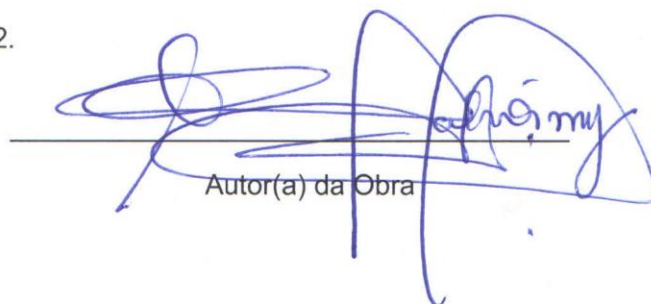
1. Engenharia Biomédica. 2. dentina. 3. erosão ácida. 4. quitosana. 5. colágeno. I. Soares, Luís Eduardo Silva, orient. II. Oliveira, Ivone Regina de , co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

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

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

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

São José dos Campos, 16 de Fevereiro de 2022.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 14 / 02 / 2022

SIDNEI NAHORNY

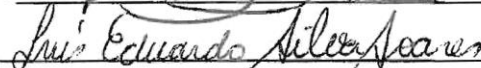
“BIOMINERALIZAÇÃO INDUZIDA POR QUITOSANA E MATERIAIS À BASE DE COLÁGENO COM FLÚOR PARA COBERTURA DE DENTINA RADICULAR SUBMETIDA À EROÇÃO.”

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

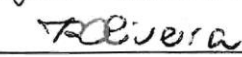
PROF.^ª DR.^ª LUCIANA BARROS SANT'ANNA



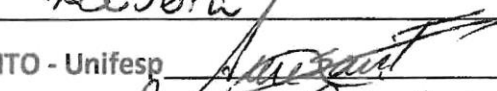
PROF. DR. LUÍS EDUARDO SILVA SOARES



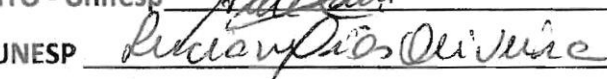
PROF.^ª DR.^ª IVONE REGINA DE OLIVEIRA



PROF.^ª DR.^ª ANA MARIA DO ESPÍRITO SANTO - Unifesp



PROF.^ª DR.^ª LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA - UNESP



Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 14 de fevereiro 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela minha vida, e aos meus orientadores prof. Dr. Luís Eduardo Silva Soares e Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira por todos os ensinamentos e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), Código de Financiamento 002.

À Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, IP&D.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo uso do equipamento de Microfluorescência de raios X por energia dispersiva (μ -EDXRF).

Biomíneralização induzida por quitosana e materiais à base de colágeno com flúor para cobertura de dentina radicular submetida à erosão

Resumo: Os materiais orgânicos como a quitosana e o colágeno podem ser uma opção promissora para o tratamento da dentina com o objetivo de biomíneralização, associados ou não ao flúor. O objetivo deste estudo foi avaliar novos materiais à base de colágeno e quitosana, associados ou não ao flúor, aplicados na dentina bovina desmineralizada e selecionar os de melhor interação com o substrato (Estudo 1), bem como o efeito da sua aplicação na dentina após a erosão dental simulada (Estudo 2). No estudo 1, dentes bovinos foram preparados e tratados com três tipos de colágeno de origem bovina (colágeno hidrolisado fibras, colágeno não-hidrolisado pó, colágeno hidrolisado pó), uma quitosana em pó e um composto de suspensão de quitosana e flúor gel. A morfologia dentinária foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e o conteúdo inorgânico da dentina foi avaliado por micro fluorescência de raios X por energia dispersiva (μ -EDXRF). Uma maior cobertura para o composto flúor/quitosana seguido do colágeno hidrolisado foi observada. O colágeno hidrolisado apresentou distribuição mais homogênea de cálcio e fósforo. A quitosana sem o flúor tem partículas irregulares e heterogêneas e resultou em pouca interação com o substrato. Os materiais com melhor interação com a dentina (Estudo 1) foram utilizados para tratamento de superfície na dentina radicular de dentes bovinos (Estudo 2). No estudo 2, foi realizada uma avaliação *in vitro*, com o objetivo de verificar a influência da quitosana ou colágeno hidrolisado, isoladamente ou em combinação com gel de fluoreto de fosfato acidulado (FFA), na composição e morfologia da dentina submetida à ciclos de erosão. Amostras de dentina bovina foram preparadas (n = 84) e tratadas com saliva artificial (AS, controle negativo), flúor fosfato acidulado em gel (F, controle positivo), suspensão de quitosana (Chi), suspensão de colágeno hidrolisado (Col), composição de flúor/quitosana (F_Chi) e composição de flúor/colágeno hidrolisado (F_Col). Ciclos erosivos (seis ciclos de imersão em suco de laranja por 1 min, seguidos de imersão em AS por 1 h) foram realizados. Os materiais foram caracterizados quanto à morfologia, composição e distribuição granulométrica. As técnicas de μ -EDXRF e MEV avaliaram a composição química inorgânica e morfologia da dentina, respectivamente. As partículas do pó de colágeno hidrolisado apresentaram uma morfologia mais regular e características esféricas quando comparado com a quitosana. Devido à sua natureza orgânica, a quitosana e o colágeno hidrolisado apresentam apenas um padrão amorfo nas análises de difração de raios x (DRX). A presença de mais bandas orgânicas no espectro FTIR provavelmente resultou em uma interação elevada com o conteúdo de colágeno da dentina previamente desmineralizada. A suspensão do grupo Col apresentou uma afinidade melhor pela superfície dentinária do que no grupo Chi. Os grupos F_Col e F apresentaram uma redução na perda de cálcio em 17% e 26%, respectivamente (p <0,001). Ambos os grupos ainda apresentavam uma camada de cobertura de aglomerados na superfície da dentina após os ciclos erosivos. O grupo F_Col produziu um padrão de cobertura semelhante ao do grupo controle positivo com a deposição de aglomerados de material à base de flúor enriquecido com colágeno. O flúor apresentou um efeito sinérgico com o colágeno hidrolisado na proteção da dentina, provavelmente devido à sua composição de aminoácidos, solubilidade e interação química com os íons F⁻, resultando na deposição de aglomerados de material à base de flúor enriquecido com colágeno. As análises de MEV e μ -EDXRF evidenciaram alterações morfológicas e na composição inorgânica significantes para todos os materiais após a erosão simulada. Os melhores resultados em relação à formação de camada protetora mais homogênea e de menor desmineralização foram obtidos no grupo de colágeno hidrolisado com flúor seguido da quitosana.

Palavras-chave: dentina, erosão ácida, quitosana, microscopia eletrônica de varredura, microfluorescência de raios-x por energia dispersiva.

Biom mineralization induced by chitosan and collagen/fluoride-based materials for eroded root dentin coverage

Abstract: Organic materials such as chitosan and collagen may be a promising option for the treatment of dentin with the objective of biom mineralization, associated or not with fluoride. The aim of this study was to evaluate new collagen and chitosan-based materials, incorporated or not into fluoride gel solutions, applied to demineralized bovine dentin and to select those with the best interaction with the substrate (Study 1), as well as the effect of their application on dentin after simulated dental erosion (Study 2). In study 1, incisor bovine teeth were prepared and treated with three types of bovine collagen (hydrolyzed collagen fibers, non-hydrolyzed collagen powder, hydrolyzed collagen powder), a chitosan powder and a compound of chitosan solution and fluoride in gel. The dentin morphology was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and the dentin inorganic content by micro energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry (μ -EDXRF). A greater surface coverage for the chitosan-fluoride followed by the hydrolyzed collagen was found. The hydrolyzed collagen showed a more homogeneous distribution of calcium and phosphorus. Chitosan without fluorine has irregular and heterogeneous particles and resulted in little interaction with the substrate. The materials with better interaction with dentin (Study 1) were used for surface treatment on the root dentin of bovine teeth (Study 2). In study 2, an assessment was performed to measure the influence of chitosan or hydrolyzed collagen, alone or combined with acidulated phosphate fluoride (APF) gel, on the composition and morphology of dentin after erosion. Bovine dentin samples were prepared ($n = 84$) and treated with artificial saliva (AS, negative control), APF gel (F, positive control), chitosan solution (Chi), hydrolyzed collagen solution (Col), fluoride/chitosan composition (F_Chi), and fluoride/hydrolyzed collagen composition (F_Col). Erosive cycles (six cycles of immersion in orange juice for 1 min, followed by immersion in AS for 1 h) were performed. The materials were characterized by their morphology, composition, and particle size distribution. Micro-energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy and scanning electron were used to evaluate the dentin's inorganic chemical composition and morphology. The hydrolyzed collagen powder particles showed a more regular morphology and spherical characteristics when compared to chitosan. Due to their organic nature, chitosan and hydrolyzed collagen show only an amorphous pattern in x-ray diffraction (XRD) analysis. The presence of more organic bands in the FTIR spectrum probably resulted in a high interaction with the collagen content of previously demineralized dentin. The suspension in the Col group showed a better affinity for the dentin surface than Chi group. The F_Col and F groups had a reduction in calcium loss by 17% and 26%, respectively ($p < 0.001$). Both groups still had a layer of agglomerate covering on the dentin surface after erosion cycles. Fluoride had a synergistic effect with hydrolyzed collagen in protecting dentin, probably due to its amino acid composition, solubility and chemical interaction with F⁻ ions, resulting in the deposition of clumps of fluoride-based material enriched with collagen. The F_Col group produced a coverage pattern similar to the positive control group with the deposition of clumps of collagen-enriched fluorine-based material. The SEM and μ -EDXRF analyzes showed significant morphological and inorganic composition changes for all materials after simulated erosion. The best results in relation to the formation of a more homogeneous protective layer and less demineralization were obtained in the group of collagen hydrolyzed with fluoride followed by chitosan.

Keywords: dentin, acid erosion, chitosan, scanning electron microscopy, dispersive energy x-ray micro fluorescence.

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1:** Esquema ilustrativo das etapas de corte dos dentes bovinos: secção na junção amelocementária (1º corte) (A), obtenção das amostras de dentina radicular (B) e secção da raiz em duas partes (2º corte) (C). 37
- Esquema 2:** Esquema representativo da ciclagem erosiva realizada nas amostras de dentina: desmineralização (A), lavagem intermediária (B), remineralização (C) e lavagem ao final do ciclo (D)..... 48
- Esquema 3:** Ilustração esquemática representativa dos efeitos dos biomateriais e tratamentos de superfície (grupos sem flúor e com flúor) aplicados na dentina e submetidos à erosão química: a) saliva artificial (AS); b) quitosana (Chi); c) colágeno hidrolisado (Col); d) flúor fosfato acidulado em gel (F); e) flúor e quitosana (F_Chi); f) flúor e colágeno hidrolisado (F_Col). 63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura hierárquica da dentina. Os túbulos dentinários com dentina peritubular mineralizada (PTD) atuam como reforços de fibra dentro da matriz de dentina intertubular (ITD) menos mineralizada. As fibrilas de colágeno mineralizadas se cruzam perpendicularmente com os túbulos dentinários. Estrutura nanométrica da fibra de colágeno com moléculas de colágeno escalonadas e hidroxiapatita depositada intrafibrilarmente (HAP).21
- Figura 2:** Morfologia dos dentes superiores e inferiores evidenciando a dentina exposta. A dentina exposta apresenta cor amarelada (setas).....23
- Figura 3:** Ilustração representativa da estrutura química da quitosana.25
- Figura 4:** Quitosana processada em forma de pó.26
- Figura 5:** Ilustração representativa da sequência 2 D de colágeno tipo I com os principais componentes de aminoácidos.....29

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1:** Sequência de passos desenvolvidos para teste e seleção dos materiais realizados na etapa 1. 34
- Fluxograma 2:** Sequência de passos para o preparo de amostras, tratamentos, erosão e análise dos biomateriais testados na etapa 2. 35

LISTA DE FOTOGRAFIAS

- Fotografia 1:** Seringa de ácido fosfórico em gel utilizada para condicionamento da dentina (A), blocos de dentina com ácido fosfórico em gel (B).....38
- Fotografia 2:** Esquema representando as etapas de preparo das suspensões: balança de precisão utilizada na pesagem dos materiais (A), amostra sendo pesada (B) diluição dos materiais em agitador magnético (C, D).39
- Fotografia 3:** Suspensões obtidas com os materiais: colágeno hidrolisado fibras (1), colágeno não-hidrolisado pó (2), colágeno hidrolisado pó (3), quitosana pó (4) e quitosana + flúor gel (5).39
- Fotografia 4:** Fotografia do equipamento de μ - EDXRF utilizado no experimento.40
- Fotografia 5:** Fotografia do equipamento de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizado no experimento.41
- Fotografia 6:** Sequência de preparo das suspensões contendo os biomateriais: pesagem (A) preparo da suspensão de quitosana (B) e colágeno (C).43
- Fotografia 7:** Figura esquemática da preparação da composição com flúor: flúor gel utilizado (A), diluição do flúor gel na suspensão de quitosana ou colágeno (B).43
- Fotografia 8:** Amostras armazenadas individualmente em frascos plásticos com 3 mL da suspensão ou composição dispersa (de acordo com a divisão do grupo) (A) e agitação dos frascos por 1 h (B).47
- Fotografia 9:** Imagens representativas da distribuição de cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície da dentina obtidas por microanálise μ -EDXRF dos tratamentos: HF_Col, NH_Col, H_Col, Chi e Chi_F. As diferentes cores representam as intensidades dos componentes Ca e P e sua distribuição na superfície dentinária.51
- Fotografia 10:** Microscopias eletrônicas de varredura representativas ilustrando as diferenças no padrão morfológico da superfície da dentina produzida pelos materiais de colágeno e quitosana (ampliação: 200 e 1000 \times). Amostra tratada com HF_Col, NH_Col, H_Col, Chi e Chi_F. As setas amarelas indicam depósitos de colágeno ou quitosana nos respectivos grupos. Barra de ampliação: 20 μ m em 200 \times e 10 μ m em 1000 \times53
- Fotografia 11:** Microscopia eletrônica de varredura do colágeno hidrolisado Col-H (a), da quitosana (b), padrões de XRD dos materiais (c) e análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (d).54
- Fotografia 12:** Imagens representativas da distribuição de cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície da dentina obtidas por microanálise em área por μ -EDXRF após o ciclo erosivo dos grupos sem tratamento com flúor (A) e com flúor na composição do tratamento (B): saliva artificial - controle negativo (AS), quitosana (Chi), colágeno (Col), flúor - controle positivo (F), flúor/quitosana (F_Chi) e flúor colágeno (F_Col). O gradiente na intensidade da escala de cores indica as variações no conteúdo de cálcio e fósforo. Os locais com alto teor de minerais são mostrados em vermelho e laranja, enquanto aqueles com baixo teor de minerais são mostrados em verde / azul.59
- Fotografia 13:** Micrografias obtidas por MEV ilustrando as diferenças no padrão morfológico de cobertura de dentina produzida pelos tratamentos dos grupos sem tratamento com flúor (A) e com flúor na composição do tratamento (B) nos aumentos de 500 e 5000 \times . A amostra tratada com saliva artificial (controle negativo, AS) apresenta: superfície erodida com túbulos dentinários expostos (setas) na dentina. A amostra tratada com suspensão de quitosana (Chi) apresenta uma camada de cobertura de partículas de quitosana. Oclusão tubular total (círculos) e oclusão parcial (seta) na superfície dentinária do grupo colágeno (Col). A amostra tratada com flúor (controle positivo, F) apresenta uma camada de cobertura de depósitos (setas). Suspensão de flúor/quitosana

(F_Chi) produziu uma camada de cobertura com túbulos dentinários obstruídos e parcialmente obstruídos (círculo e setas). Camada de cobertura de aglomerados (setas) na superfície dentinária do grupo flúor/colágeno (F_Col). Os aglomerados são destacados em maior ampliação (setas). Barras de ampliação: 40 μm (500 \times) e 5 μm (5000 \times).60

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Curvas médias (n = 14) obtidas pelo mapeamento em linha por μ -EDXRF em distância (mm) percorrida na superfície para o teor de cálcio (a, c) e fósforo (b, d) (%) considerando os grupos de tratamentos: (1) sem flúor e (2) com flúor. A alteração no conteúdo inorgânico foi calculada (%). AS, saliva artificial; Chi, quitosana; Col, colágeno hidrolisado; F, flúor; F_Chi, flúor/quitosana; F_Col, flúor/colágeno hidrolisado. Asterisco (*) indica o grupo com a menor redução de cálcio após erosão (F_Col: -17%). 56
- Gráfico 2:** Média e desvio padrão (n = 14) da porcentagem em peso de cálcio (Ca) e fósforo (P) (% em peso) e da razão molar cálcio/fósforo da dentina obtida via mapeamento em linha por μ -EDXRF de acordo com o grupo experimental. As comparações estatísticas foram realizadas entre antes (a-c) e após a erosão (d-f). Teste de comparação múltipla de Bonferroni: antes vs. depois do tratamento. As letras diferentes representam diferenças estatísticas entre a primeira (1-antes da erosão: barra cinza) e a segunda medição (2-após a erosão: barra preta) (p <0,001) (a-c). Teste de comparação múltipla de Dunnett: entre o grupo de controle negativo (NC) e os tratamentos e entre o grupo de controle positivo (PC) e os tratamentos (d-f)..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais do estudo 1.	38
Tabela 2: Descrição das etapas de análise, número de amostras e técnicas analíticas usadas para os grupos experimentais e controle (positivo e negativo).....	45
Tabela 3: Resultados obtidos pelo mapeamento em área por μ -EDXRF, após o tratamento da superfície dentinária com biomateriais. Valores máximo, mínimo, média, desvio padrão (D.P.) e coeficiente de variação (C.V.) das porcentagens (% -peso) de cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície da dentina.	50
Tabela 4: Bandas mostradas nos espectros (cm^{-1}) obtidos para amostras de colágeno hidrolisado e quitosana.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-Chi - quitosana fosforilada alcalina

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais.

Chi - Quitosana

Chi_F – Quitosana/flúor

DRX - Difração de Raios X

F – flúor gel

F_Chi - Flúor/quitosana

F_Col – Flúor/colágeno hidrolisado pó

FDA - Food and Drug Administration

FDP - fluoreto de diamino de prata

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

H_Col - Colágeno hidrolisado pó

HF_Col - Colágeno hidrolisado fibras

MEC - matriz extracelular

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MMPs - metaloproteinases de matriz

NH_Col - Colágeno não-hidrolisado pó

μ -EDXRF – Micro-energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy (Microfluorescência de raios X por energia dispersiva)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
2.2.1 Estudo experimental de avaliação e seleção dos biomateriais	19
2.2.2 Estudo experimental de avaliação dos biomateriais após erosão dental	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Composição da dentina e perda de estrutura dental	20
3.2 Tratamento da erosão dental	23
3.2.1 Flúor	23
3.2.2 Quitosana	25
3.2.3 Colágeno	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Etapa 1: Caracterização da aplicação na dentina de materiais compostos de colágeno, quitosana e quitosana associada ao flúor	36
4.1.1 Preparo das amostras	36
4.1.2 Tratamentos de superfície, preparo das suspensões contendo biomateriais e aplicação na estrutura dental	37
4.1.3 Análise do conteúdo inorgânico das amostras por μ -EDXRF	40
4.1.4 Análise morfológica de superfície por MEV	41
4.2 Etapa 2: Aplicação dos materiais selecionados e avaliação das alterações ocorridas na superfície da dentina após a erosão	41
4.2.1 Caracterização da quitosana e do colágeno hidrolisado	41
4.2.2 Preparo das amostras de dentes bovinos	42
4.2.3 Preparo das suspensões contendo biomateriais	42
4.2.4 Análise inicial do conteúdo inorgânico e seleção das amostras por μ -EDXRF	44
4.2.5 Aplicação dos tratamentos de superfície	46
4.2.6 Realização dos ciclos erosivos	47
4.2.7 Análise final do conteúdo inorgânico e seleção das amostras por μ -EDXRF	48
4.2.8 Análise da morfologia de superfície por MEV	49
4.2.9 Análise estatística	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Resultados da Etapa 1	50
5.2 Resultados da Etapa 2	54
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	70
8 PUBLICAÇÕES	71
8.1 Artigo 1	71
8.2 Artigo 2	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)	79

1 INTRODUÇÃO

A remineralização da dentina é um procedimento com relevância clínica no tratamento da cárie, hipersensibilidade dentinária e erosão dentária (DI FOGGIA et al., 2019). Entender como os componentes presentes na dentina interagem com os biomateriais é importante para selecionar e produzir compostos contendo materiais que exerçam uma interação mais direta por afinidade iônica e química com os componentes da dentina. Na busca de materiais aplicados com objetivos de prevenção e de tratamento da erosão dental, os tratamentos que promovem a biomineralização da dentina são foco de pesquisas com diferentes materiais e processos de produção e aplicação (GAJJERAMAN et al., 2007; NIU et al., 2014; CAO et al., 2015; DI FOGGIA et al., 2019).

Essa busca por materiais que forneçam algum nível de proteção para a estrutura dental ou com capacidade de remineralização é evidenciada pelo crescente aumento na incidência da erosão dental o que é um fenômeno global (JAEGGI; LUSI, 2014; KITASAKO et al., 2021). Devemos considerar que o processo erosivo ocorre de maneira diferente nos substratos de esmalte e dentina às suas diferenças histopatológicas. No esmalte, a erosão é mencionada como uma desmineralização superficial seguida de “amolecimento ou amaciamento” e perda de substância. Na dentina a erosão inicia-se com uma perda mineral entre a dentina peritubular e intertubular com a subsequente perda de dentina peritubular e alargamento da entrada dos túbulos dentinários (MEIRA, 2021). A erosão da dentina é particularmente mais evidente em adultos com exposição radicular fisiológica ou patológica, e a consequência clínica mais relevante seria a hipersensibilidade dentinária e um aumento da estagnação do biofilme (MEIRA, 2021).

Dentre as técnicas de proteção ou remineralização da estrutura dental podemos citar a biomineralização onde ocorre um processo em que macromoléculas orgânicas atuam como modelos para a nucleação e crescimento de cristais minerais mediado por uma matriz orgânica para formar materiais híbridos ordenados hierarquicamente, como ossos ou dentes (DI FOGGIA et al., 2019).

A busca por materiais que tenham alguma afinidade pela dentina permite o desenvolvimento de novos tratamentos de superfície que apresentem a capacidade de proteger a dentina contra situações de perda mineral (desmineralização), bem como tratar a dentina por incorporação de íons ou partículas após processos erosivos (remineralização). Algumas estratégias biomiméticas foram desenvolvidas para reduzir a desmineralização do colágeno,

inspiradas no comportamento da matriz proteica nos processos de biomineralização (GAJJERAMAN et al., 2007; TAY; PASHLEY, 2008; KIM et al., 2010; NIU et al., 2014; CAO et al., 2015; DI FOGGIA et al., 2019).

Dentre as estratégias de biomineralização podemos destacar o tratamento com quitosana fosforilada (XU et al., 2011). A aplicação da quitosana como um agente para tratar a erosão dentária apresentou resultados promissores onde o material demonstrou exercer um efeito protetor significativo na estrutura dental (URURAHY et al., 2017). A associação de quitosana com fluoreto também foi testada anteriormente na forma de um bioadesivo de micropartículas de fluoreto de quitosana demonstrando propriedades positivas de mineralização da dentina (KEEGAN et al., 2012).

Outro biomaterial de destaque e pouco estudado para aplicação em erosão dental é o colágeno. O papel que o colágeno desempenha durante o processo de biomineralização também avançou com o desenvolvimento de uma melhor compreensão do sistema. Por muito tempo, acreditou-se que o colágeno servia apenas como uma matriz estrutural e era considerado inativo na biomineralização (YU; WEI, 2021). No final da década passada, foi descoberto que o colágeno desempenha um papel ativo no processo de mineralização da apatita. Este fato foi apoiado pela descoberta de uma região carregada positivamente existente nas fibrilas de colágeno na interface das zonas de lacuna e sobreposição (NUDELMAN et al., 2010). Ao analisar sistematicamente a sequência de aminoácidos primária do colágeno tipo I humano, foi revelado que o colágeno é um biomacromolécula enriquecida com múltiplos aminoácidos carregados (SILVER; LANDIS, 2011; YU; WEI, 2021).

Os materiais biomiméticos à base de colágeno-hidroxiapatita são uma alternativa promissora para acelerar a remineralização da dentina para o reparo de defeitos dentais em um estágio de condições patológicas (YU; WEI, 2021). No geral, a mineralização biomimética do colágeno torna-se uma estratégia essencial para o desenvolvimento de materiais inspirados em estruturas biológicas do próprio organismo com diversas aplicações odontológicas.

Tradicionalmente o uso de produtos fluoretados é o método mais utilizado na proteção da estrutura dental e na remineralização após processos erosivos. O flúor tem como vantagem ser um material acessível e difundido, mas tem a desvantagem de ser um tratamento parcialmente eficaz, pois necessita de várias aplicações para obter proteção significativa (GANSS, et al., 2004)

Considerando as características e a composição do colágeno, o papel que a matriz orgânica desempenha na nucleação e no crescimento de partículas minerais e a alta porção

orgânica da dentina, o colágeno ou produtos contendo colágeno podem ser fontes para uma possível mineralização ou proteção da dentina. Além disso, a incorporação de quitosana ou colágeno em produtos fluoretados também pode ser uma opção para proteção ou tratamento da dentina. Diante desta motivação evidenciada pela literatura, este estudo avaliou a possibilidade da aplicação de novos materiais à base de colágeno e quitosana na dentina bovina desmineralizada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar, *in vitro*, o efeito de novos materiais à base de colágeno e quitosana, associados ou não ao flúor, aplicados na dentina bovina submetida à processos erosivos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estudo experimental de avaliação e seleção dos biomateriais

Caracterizar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e micro fluorescência de raios X por energia dispersiva (μ -EDXRF) a cobertura de superfície na dentina radicular bovina desmineralizada após aplicação dos materiais colágeno hidrolisado (fibras), colágeno não hidrolisado (pó), colágeno hidrolisado (pó), quitosana (pó) e a combinação de quitosana em pó com flúor fosfato acidulado em gel.

Selecionar os materiais com melhor cobertura de superfície na dentina radicular bovina desmineralizada.

2.2.2 Estudo experimental de avaliação dos biomateriais após erosão dental

Caracterizar por MEV, difração de raios X (XRD), distribuição de tamanho de partícula e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), os materiais quitosana e colágeno hidrolisado.

Avaliar por MEV, as alterações morfológicas ocorridas na superfície da dentina radicular tratada com compósitos de quitosana, flúor e colágeno após a erosão.

Analisar por μ -EDXRF, os componentes inorgânicos da dentina radicular tratada com compósitos de quitosana, flúor e colágeno após a erosão simulada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A dentina desempenha um papel crucial na manutenção da integridade estrutural dos dentes. Como um biocompósito, ele atinge o equilíbrio entre rigidez e tenacidade por meio de uma interação entre as frações inorgânicas e orgânicas (HASHMI; ZHANG; KISHEN, 2019).

3.1 Composição da dentina e perda de estrutura dental

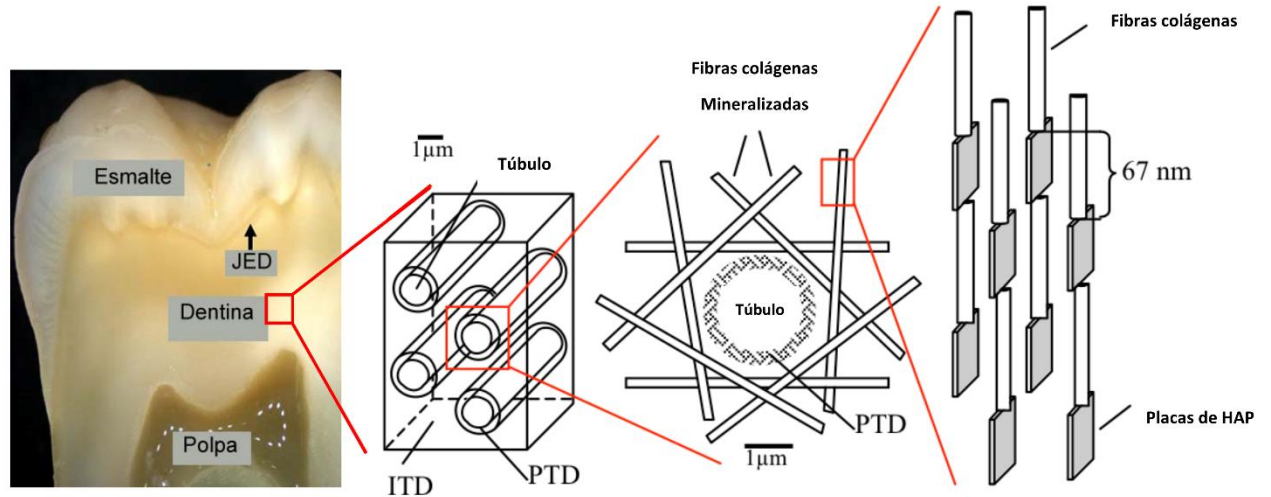
Uma camada espessa de dentina forma a maior parte do dente, sustentando o esmalte altamente mineralizado que encapsula a coroa e o cimento (LEUNG et al., 2021). A porção radicular do elemento dental é recoberta por uma fina camada de cimento. Esta estrutura, em conjunto com as fibras do ligamento periodontal, proporcionam a fixação dos dentes ao alvéolo ósseo. Internamente em sua porção central da coroa e da raiz, os dentes contêm as polpas dentárias (GOLDBERG et al., 2011).

Tanto o esmalte como a dentina são compostos por uma fase mineral à base de cristais de apatita e outra fase orgânica constituída principalmente de água, proteínas e lipídeos. Em ambos a porcentagem volumétrica da fase mineral predomina, sendo que o esmalte com 85% de cristais de apatita é uma estrutura muito mais mineralizada que a dentina com apenas 47% (Garone Filho; Silva, 2008).

A dentina é uma estrutura complexa de um material biológico hidratado a qual possui uma microestrutura distinta caracterizada por micro túbulos que a interligam com a polpa dental (NAHORNY et al., 2017). Ela contém cerca de 50% do volume mineral sob a forma de uma apatita carbonatada (ADDY, 2005), 30% de material orgânico (a maior parte do material orgânico é colágeno do tipo I), e 20% do volume do fluido (ADDY, 2005; NAHORNY et al., 2017).

Compondo a porção mineral da dentina, tem-se a hidroxiapatita, que consiste de minerais de fosfato de cálcio e responde pelo principal tipo de apatita encontrada nos tecidos dentais. Os cristais de hidroxiapatita carbonatada com deficiência de cálcio (50 x 10 nm) estão dispostos intrafibrilarmente e extrafibrilarmente em relação às fibrilas de colágeno (Figura 1). O colágeno tipo I existe como uma estrutura fibrilar com as fibrilas orientadas em um plano perpendicular ao dos túbulos dentinários. (Figura 1) (HASHMI, 2019).

Figura 1: Estrutura hierárquica da dentina. Os túbulos dentinários com dentina peritubular mineralizada (PTD) atuam como reforços de fibra dentro da matriz de dentina intertubular (ITD) menos mineralizada. As fibrilas de colágeno mineralizadas se cruzam perpendicularmente com os túbulos dentinários. Estrutura nanométrica da fibra de colágeno com moléculas de colágeno escalonadas e hidroxiapatita depositada intrafibrilarmente (HAP).



Fonte: adaptado de Park; Schneider; Haak (2013) e Hashmi (2019).

Embora seja geralmente inacessível ao ambiente oral, a dentina pode ficar exposta a ácidos na boca após a perda do esmalte ou do cemento devido a atrito dentário, abrasão, erosão ou após fratura dentária (LEUNG et al., 2021). O desgaste dentário é o resultado de três processos: abrasão (desgaste produzido pela interação entre dentes e outros materiais), atrição (desgaste por contato dente-dente) e erosão (dissolução de tecido duro por substâncias ácidas) evidenciado por áreas de dentina exposta (Figura 2: cor amarela, setas). Um processo adicional (abfração) pode potencializar o desgaste por abrasão e / ou erosão. As observações clínicas e experimentais mostram que os mecanismos de desgaste individuais raramente agem sozinhos, mas interagem entre si (SHELLIS; ADDY, 2014).

Considerando apenas a erosão dental, esta ocorre quando os tecidos dentais duros sofrem a ação de substâncias químicas ácidas sem o envolvimento de bactérias, ocorrendo após a ingestão de alimentos ácidos como frutas, embutidos, bebidas, medicamentos (origem extrínseca) ou ainda em processos patológicos onde ocorrem o contato do suco gástrico com os dentes (origem intrínseca) (GANSS et al., 2011; GANSS; KLIMEK; SCHLUETER, 2014; NAHORNY et al., 2017; HABASHI et al., 2021; KÖRNER et al., 2021; LEUNG et al., 2021).

O processo erosivo afeta tanto o esmalte quanto a dentina. Porém, a progressão é mais rápida na dentina do que no esmalte devido à elevada porção orgânica desta (DE SOUZA et al.,

2021). A desmineralização da dentina é uma perda gradual e irreversível na estrutura mineralizada dos dentes (LUSSI et al., 2011; SOARES et al., 2012).

Inicialmente, a perda de minerais em dentina ocorre quando há a perda de dentina peritubular, acarretando assim o aumento do número e do diâmetro dos túbulos dentinários expostos e, finalmente, a desmineralização da dentina intertubular com exposição da matriz orgânica (SCHLÜTER et al., 2011) o que pode resultar em uma superfície rugosa e porosa (URURAHY et al., 2017). O desenvolvimento de erosão envolve um processo químico, em que a fase inorgânica do dente é desmineralizada, reduzindo desse modo a dureza dos substratos dos dentes (LUSSI et al., 2011).

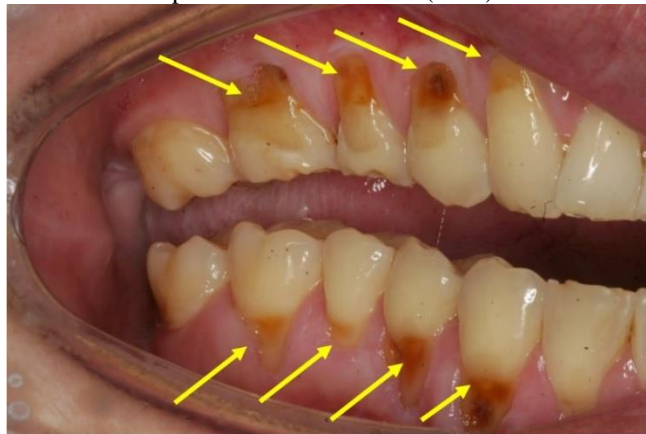
A prevalência de erosão dentária vem aumentando em países industrializados (HAMMOUDI et al., 2019; DE SOUZA et al., 2021), especialmente em crianças e jovens com excesso de peso (TSCHAMMLER et al., 2019), devido à alta ingestão de bebidas energéticas e isotônicas por atletas e também de frutas cítricas (O'TOOLE et al., 2017), mas também pode estar relacionado com uma melhora proporcionada por um exame clínico mais detalhado e correto diagnóstico por parte dos profissionais (KÖRNER et al., 2021).

O desgaste dentário erosivo ou desgaste dentário é comum com até 29% dos adultos jovens apresentando alguns sinais da doença. Na infância há uma elevada prevalência da erosão dental devido às características físico-químicas, estruturais e morfológicas dos dentes decíduos. Estes possuem uma fina camada de esmalte e dentina, esmalte mais poroso, menor grau de mineralização e, portanto, elevada solubilidade (CUNHA; OLIVEIRA, 2020). De fato, já se demonstrou que a progressão da erosão em esmalte decíduo é 1,5 x maior que no substrato permanente (ROCHA et al., 2011). Mas são as faixas etárias maiores que apresentam níveis mais elevados de desgaste, à medida da passagem do tempo e o uso do elemento dental impactam na forma dos dentes (BARTLETT; O'TOOLE, 2019). O desgaste dentário é uma experiência comum e, para a maioria, um resultado quase universal do envelhecimento. Uma proporção relativamente pequena de adultos tem níveis graves, cerca de 2–4% para as idades mais jovens, mas isso aumenta para cerca de 10% na velhice (BARTLETT; O'TOOLE, 2019).

As bebidas adoçadas com açúcar, limonadas e sucos de frutas apresentam um valor de pH bastante baixo (REDDY et al., 2016) e elas podem não ser apenas um potencial fator de risco para obesidade e cárie, mas também para desgaste dentário erosivo. Embora a prevalência geral de cárie dentária esteja diminuindo substancialmente nas últimas décadas, o desgaste dentário erosivo tem ganhado importância cada vez maior (JAEGGI; LUSI, 2014; TSCHAMMLER et al., 2019).

Para prevenir a progressão da erosão dentária, deve ser realizado um diagnóstico precoce e os fatores causadores da erosão devem ser identificados para que medidas de proteção possam ser tomadas logo no início (LUSSI; JÄGGI, 2008). No entanto, como os principais fatores causadores da erosão dependem dos hábitos individuais, é difícil controlá-los. Portanto, estratégias de tratamento padrão foram desenvolvidas para prevenir a erosão (SARIALIOGLU GUNGOR; DONMEZ, 2021).

Figura 2: Morfologia dos dentes superiores e inferiores evidenciando a dentina exposta. A dentina exposta apresenta cor amarelada (setas).



Fonte: www.google.com (adaptada pelo autor).

3.2 Tratamento da erosão dental

Dentre as estratégias de tratamento padrão desenvolvidas para prevenir a erosão, o método tradicional e mais acessível é a utilização de produtos fluoretados.

3.2.1 Flúor

Não há dúvida sobre a importância do flúor para a prevenção da cárie dentária, pois é a primeira linha de defesa, juntamente com a educação, para prevenir o aparecimento de cáries. O flúor é o único composto reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA para a prevenção da cárie dentária; no entanto, nem todos os produtos que contêm flúor são reconhecidos pelo FDA para proteção contra cárie (CAREY, 2014).

O flúor é aplicado tradicionalmente nos dentes nas formas sistêmica ou tópica para auxiliar na prevenção da cárie dentária. O fluoreto tópico é proveniente de fontes como água comunitária, alimentos processados, bebidas, cremes dentais, enxaguatórios bucais, géis, espumas e vernizes (CAREY, 2014). A incorporação do flúor à estrutura dental não é

considerada como uma impureza, pois ao contrário do que ocorre com os outros minerais, o flúor melhora as propriedades físico-químicas da estrutura dental, de tal forma que a fluorapatita é a menos solúvel das apatitas (GARONE FILHO; SILVA, 2008). O pré-tratamento tópico com flúor pode ser usado na prevenção de erosão, porém é apenas parcialmente eficaz e requer um regime intensivo de fluoretação para obter proteção significativa (GANSS et al., 2004; SOUZA et al., 2020).

O papel do fluoreto na terapia da erosão tem sido questionado há muito tempo. No entanto, pesquisas recentes produziram resultados positivos (HUYSMANS; YOUNG; GANSS, 2014; BOLIS; HÄRTLI; LENDENMANN, 2015; KÖRNER et al., 2021). A absorção de flúor pelo esmalte após a aplicação de vernizes fluoretados foi comparada com a liberação de flúor na saliva artificial. A hipótese era que a absorção de flúor é maior para produtos que exibem liberação mais rápida de flúor (BOLIS; HÄRTLI; LENDENMANN, 2015). A adição de sais de polifosfato inorgânicos a produtos fluoretados mostrou-se positiva no aumento de sua eficácia contra a cárie (CONCEIÇÃO et al., 2015).

Os cremes dentais (dentifrícios) são considerados veículos eficazes e economicamente viáveis para melhorar a resistência do esmalte e dentina, e a incorporação de agentes protetores em dentifrícios tornou-se cada vez mais comum (KATO et al., 2010). As formulações de dentifrícios foram modificadas para controlar a erosão do esmalte e da dentina (GANSS; SCHULZE; SCHLUETER, 2013). Os cremes dentais dessensibilizantes contendo cálcio, sódio, fosfato e silicato podem ser uma opção para tratamento da hipersensibilidade dentinária associada com a erosão dental (LOPES et al., 2021). Entretanto, é recomendado avaliar corretamente os hábitos do paciente com hipersensibilidade dentinária decorrente de erosão dental. Caso o paciente apresente alto risco de desgaste erosivo, a indicação do uso de um creme dental anti-erosivo e dessensibilizante pode não trazer benefícios adicionais se a dieta não for reavaliada e controlada (LOPES et al., 2021).

Os estudos mais recentes avaliando o uso de produtos fluoretados na proteção da dentina frente à desmineralização por erosão mostram que novos compostos contendo ou não flúor estão sendo testados na busca de um produto mais eficaz (BEZERRA et al., 2019; AINOOSAH et al., 2020).

Bezerra et al. (2019) avaliaram o efeito anti-erosivo de soluções contendo fluoreto de sódio (F), cloreto estano (Sn) e alguns polímeros formadores de filme (Gantrez, alginato de propilenoglicol, poli vinilpirrolidona e carboximetilcelulose) sobre esmalte dentário e dentina.

Foi observado que os polímeros exibiram um efeito anti-erosivo no esmalte e o alginato de propilenoglicol aumentou a proteção do flúor.

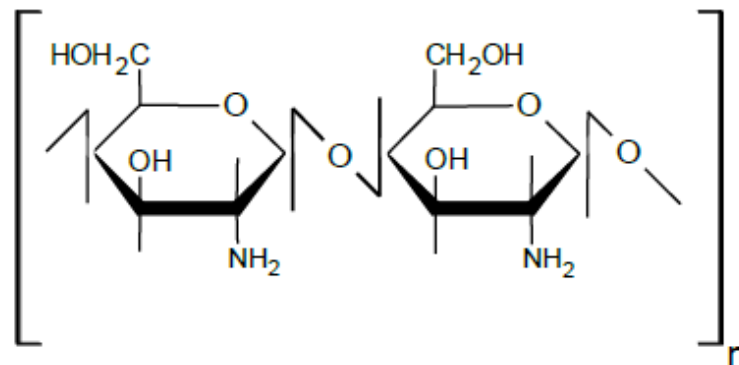
Ainoosah et al. (2020) investigaram a capacidade do fluoreto de diamino de prata (FDP) para prevenir o desgaste dentário erosivo no esmalte e dentina. Os autores compararam o FDP (38%) com a água deionizada (controle negativo), fluoreto de potássio (controle de flúor), nitrato de prata (controle de prata) e verniz fluoretado (referência clínica) usando modelos de ciclagem de erosão e erosão-abrasão. Foi verificado que o fluoreto de diamino de prata foi eficaz na redução da erosão dentária em ambos os substratos, mas erosão-abrasão dental foi reduzida apenas na dentina.

Apesar da efetividade comprovada do flúor como agente de prevenção da desmineralização da estrutura dental, há uma crescente busca por novas opções de biomateriais para a proteção da estrutura dental, dentre eles a quitosana.

3.2.2 Quitosana

A quitosana pode ser definida como um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose, de composição variável em função do grau residual de acetilação, cujas unidades também são unidas por ligações glicosídicas β -(1,4). Durante a reação, os grupamentos acetamido (-NHCOCH₃) da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino (-NH₂), dando origem a quitosana (RODRIGUES et al., 2020). A figura 3 ilustra esquematicamente a estrutura química da quitosana.

Figura 3: Ilustração representativa da estrutura química da quitosana.



Fonte: Rodrigues et al. (2020).

A quitosana é um polissacarídeo obtido por meio da desacetilação da quitina e tem atraído muita atenção como um biomaterial funcional promissor devido à sua disponibilidade,

biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-toxicidade (RINAUDO, 2006; TIAN et al., 2012; URURAHY et al., 2017). É um material hipoalergênico e bio-tolerado pois ela não estimula a inflamação quando implantada (RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ et al., 2015; DE MASI et al., 2019).

É produzida a partir da quitina, um elemento estrutural encontrado no exoesqueleto de crustáceos, como camarões, lagostas e caranguejos. No processo de produção, as conchas destes crustáceos são primeiro removidas e depois moídas em pó, o qual é posteriormente processado para produzir a quitosana (Figura 4). A quitosana também ocorre naturalmente em alguns microrganismos, como fungos e leveduras (ILLUM et al., 2001).

Embora a quitosana seja estruturalmente semelhante à celulose, ela contém, além dos grupos hidroxila, acetilamina ou grupos amino livres, que apresentam propriedades muito diferentes daquelas da celulose (HWANG; SHIN, 2000). A quitosana exibe uma boa mucoadesão, e *in vivo* demonstrou ser retida na mucosa oral por várias horas mesmo quando utilizada na forma de um simples enxague aquoso (KEEGAN et al., 2012). Além disso, a quitosana exibe uma atividade antibacteriana contra uma variedade de patógenos orais agindo por meio de uma ruptura da membrana celular (KEEGAN et al., 2012).

A quitosana possui boa interação com tecidos mineralizados como o osso, pois possui grupos funcionais de hidroxila, carboxila e aminas que auxiliam a ligação com partículas biológicas que promovem por exemplo a regeneração óssea, permitindo sua funcionalização por misturar outros polímeros ou compostos para melhorar suas propriedades (MONÁRREZ-CORDERO et al., 2021). Na estrutura dental, a quitosana é capaz de se aderir à superfície da hidroxiapatita prevenindo o desgaste erosivo (LEE et al., 2012) e a perda de íons fosfato (ARNAUD; DE BARROS NETO; DINIZ, 2010; BELTRAME, 2016). A quitosana aplicada em dentina, tem a capacidade de produzir arranjos microfibrilares e assim estabilizar o colágeno dentinário, produzindo propriedades mecânicas melhoradas no substrato (DASH et al., 2011).

Figura 4: Quitosana processada em forma de pó.



Fonte: google.com.br

Considerando as propriedades bioativas da quitosana e os efeitos benéficos da aplicação do flúor como terapia de prevenção da cárie e da erosão dental, alguns estudos buscam avaliar a associação da quitosana com o flúor.

A quitosana foi testada com sucesso como forma de aumentar a viscosidade, para controlar a liberação do flúor, e para melhorar o efeito protetor dos dentifrícios (com ou sem flúor) contra o desgaste dentário erosivo (GANSS et al., 2012; KEEGAN et al., 2012; GANSS; KLIMEK; SCHLUETER, 2014). O provável mecanismo relatado foi de que a quitosana aumenta a retenção de sais de estanho e flúor na estrutura dentária desmineralizada (PINI et al., 2016).

Apresentou-se como um veículo efetivo para liberar flúor, aplicando-se em um bioadesivo de quitosana com micropartículas de flúor, as quais mostraram liberação prolongada de fluoreto (KEEGAN et al., 2012). Quando adicionada a cremes dentais, a quitosana possui um efeito antierosivo sobre o esmalte (GANSS et al., 2012), o qual é aumentado quando associado a íons flúor (GANSS et al., 2011). Os efeitos desse creme dental na dentina são menos significativos (GANSS; KLIMEK; SCHLUETER, 2014).

A modificação da molécula de quitosana através da adição de íons fósforo foi descrita inicialmente em 1984 a fim de torná-la solúvel em água (NISHI et al., 1984; BELTRAME, 2016). Além da solubilidade em pH neutro, a quitosana fosforilada apresenta, como vantagem à quitosana pura, uma maior capacidade de quelar íons cálcio devido aos grupos fosfato (YOKOGAWA et al., 1997; BELTRAME, 2016).

Em esmalte, a aplicação de nanopartículas de quitosana fosforilada com fosfato de cálcio amorfo resultaram em uma remineralização padrão semelhante ao esmalte dental sadio e diferente do padrão de remineralização produzido pelo flúor (ZHANG et al., 2018). Na dentina, a quitosana fosforilada foi capaz de modificar a dentina desmineralizada, favorecendo a deposição de íons cálcio e fosfato (XU et al., 2011). URURAHY et al. (2017), avaliaram o efeito da quitosana, nas concentrações de 2,5% e 5,0%, sobre a molhabilidade da dentina erodida, seguido de uma avaliação da morfologia superficial por MEV. Foi verificado que a quitosana, independentemente da concentração usada, não influenciou a molhabilidade da dentina erodida e que, pela análise por MEV, foram encontradas partículas de quitosana depositadas na superfície e no interior dos túbulos dentinários. Também foi observado em dentina, um efeito protetor *in vitro* da quitosana comparável ao cloreto de estanho/fluoreto de amina/fluoreto de sódio ($\text{SnCl}_2/\text{AmF}/\text{NaF}$) contra erosão dentinária (SOUZA et al., 2020). Os

autores demonstraram que a quitosana teve efeito de cobertura dos túbulos dentinários sendo aplicada logo após a erosão simulada em solução de ácido cítrico a 0,1% (SOUZA et al., 2020).

Um estudo clínico recente avaliou em 22 pacientes a influência do pré-tratamento com solução de quitosana nanoparticulada a 2,5% na dentina erodida antes do tratamento dentário restaurador (DE SOUZA et al., 2021). Os autores avaliaram os critérios de retenção da restauração, cárie secundária, adaptação marginal e sensibilidade e critérios fotográficos (cor, pigmentação marginal, e forma anatômica) após 7 dias e 1 ano da colocação de restaurações de resina nos dentes. Foi concluído que a aplicação de quitosana nanoparticulada na dentina erodida não aumentou as falhas nas restaurações de resina após 1 ano e este material pode ser usado como uma solução de pré-tratamento (DE SOUZA et al., 2021).

Beltrame et al. (2018) testaram o efeito anti-erosivo de soluções experimentais contendo quitosana fosforilada em dentina submetida a ciclos de tratamento de des-remineralização e descobriram por MEV que a solução experimental de AP-Chi (quitosana fosforilada alcalina 0,5%) apresentou um efeito favorável na manutenção da integridade das fibrilas de colágeno da dentina quando imersa em ácido cítrico.

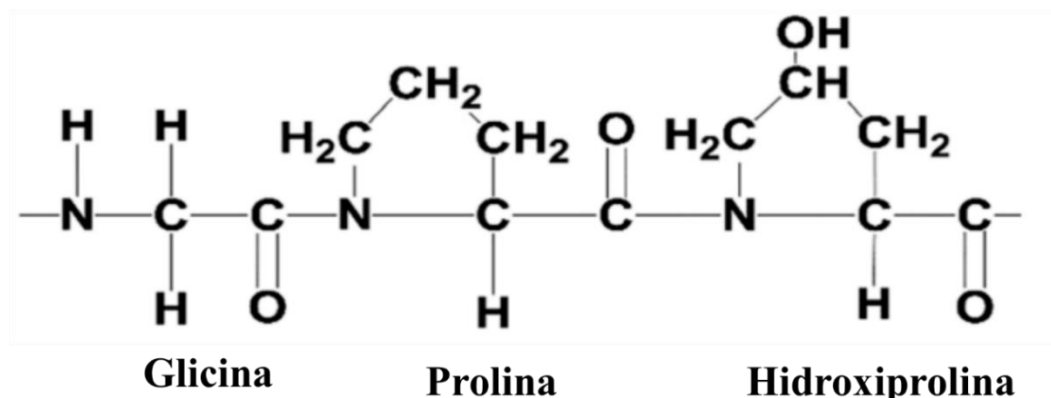
O tratamento da dentina com o controle positivo, cloreto de estanho/fluoreto de amina/fluoreto de sódio ($\text{SnCl}_2/\text{AmF}/\text{NaF}$) resultou em uma superfície de colágeno mineralizado preservada. Esta manutenção das fibras colágenas intactas é muito importante para a prevenção da erosão na dentina. A preservação da integridade das fibrilas de colágeno pode fornecer maior resistência à desmineralização por meio da saída de íons cálcio e fosfato (BELTRAME et al., 2018). Além deste aspecto, os autores concluíram que a preservação da arquitetura de colágeno no grupo AP-Chi, em comparação com os outros grupos de quitosana, também pode ter oferecido uma melhor chance de remineralização em momentos onde a estrutura da dentina entra em contato com produtos que permitem a remineralização.

O efeito protetor de soluções experimentais contendo quitosana em diferentes viscosidades com ou sem tetrafluoreto de titânio/fluoreto de sódio (TiF_4/NaF) foi testado anteriormente na desmineralização da dentina *in vitro* em comparação com uma solução comercial de $\text{SnCl}_2/\text{AmF}/\text{NaF}$ (SOUZA et al., 2020). Os autores constataram que apenas a quitosana foi capaz de reduzir significativamente a perda de dentina em relação ao controle negativo (água deionizada), sendo semelhante ao controle positivo ($\text{SnCl}_2/\text{AmF}/\text{NaF}$) (SOUZA et al., 2020).

3.2.3 Colágeno

O colágeno é uma proteína formada por cadeias dos aminoácidos como glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina, que estão organizadas de forma paralela. São conhecidos cerca de 29 tipos diferentes de colágeno, que se diferenciam na composição de aminoácidos, nos arranjos, no diâmetro e na localização dos tecidos. Com uma estrutura molecular simples, o colágeno é insolúvel em água em virtude da grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos. Eles também se destacam por formar fibras insolúveis com grande força elástica e com capacidade de hidratação (SILVA; PENNA, 2012; VAN GULICK et al., 2019). A sequência de aminoácidos no colágeno é, em geral, uma unidade tripeptídica, glicina-X-prolina ou glicina-X-hidroxiprolina, onde o X pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos-padrão (SILVA; PENNA, 2012; VAN GULICK et al., 2019). A figura 5 representa esquematicamente uma cadeia de colágeno.

Figura 5: Ilustração representativa da sequência 2 D de colágeno tipo I com os principais componentes de aminoácidos.



Fonte: Adaptado de Van Gulick et al. (2019).

O colágeno pode oferecer uma vantagem adicional quando utilizado como matéria-prima de um biomaterial, pois possui a capacidade de interagir favoravelmente com as células através de domínios específicos de reconhecimento presentes na estrutura celular. O colágeno, é composto por três cadeias polipeptídicas unidas por pontes de hidrogênio e enroladas uma em torno da outra em um arranjo helicoidal, formando fibras. Estas hélices triplas apresentam, como característica relevante, uma elevada resistência à tração. O colágeno é o principal componente da matriz extracelular, sendo um substrato natural para as células, orientando e estimulando a formação tecidual (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

O colágeno apresenta estrutura molecular relativamente simples e é insolúvel em água, em virtude da grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos, quer no interior da proteína, quer na superfície. O colágeno pode ser obtido de diversas espécies animais (bovinos, suínos, peixes, etc.) (SILVA; PENNA, 2012) e em sua forma bruta (fibras ou pó), pode ser submetido à reação de hidrólise, a qual leva à produção da gelatina e do colágeno hidrolisado (WALRAND et al., 2008). A característica mais importante do colágeno hidrolisado é a sua composição de aminoácidos, fornecendo um alto nível de glicina e prolina, dois aminoácidos essenciais para a estabilidade e a regeneração das cartilagens (SILVA; PENNA, 2012).

Como um polímero extraído naturalmente da matriz extracelular (MEC), os materiais à base de colágeno demonstram excelente biocompatibilidade e suporte para adesão celular, proliferação, migração e diferenciação. Como resultado, eles têm sido amplamente utilizados em muitas aplicações biomédicas, como entrega de medicamentos, engenharia de tecidos, cicatrização de feridas e cirurgia estética (LUTOLF; GILBERT; BLAU, 2009; YOO; HAN; HAN, 2017; LIN et al., 2019; YU; WEI, 2021).

O principal componente orgânico do osso e da dentina é o colágeno tipo I e este possui uma estrutura complexa (YU; WEI, 2021). A composição da dentina difere do esmalte em termos de sua porção de matriz orgânica e microestrutura e as fibrilas de colágeno na dentina servem como arcabouço para cristalitos minerais que reforçam a matriz, apoiando o esmalte circundante (BERTASSONI et al., 2009).

O colágeno participa do processo de biomineralização da dentina e este processo envolve a interação de proteínas não colágenas, como fosfoproteínas e proteoglicanos, com as fibrilas de colágeno (DECHICHI et al., 2007). A mineralização ocorre em locais espacialmente independentes em todas as matrizes extracelulares orgânicas. As fibrilas de colágeno podem servir como centros de nucleação independente de minerais. Na nucleação heterogênea, as proteínas não colágenas interagem com as fibrilas de colágeno para controlar especificamente onde os íons de cálcio e fosfato serão aprisionados, iniciando desta forma a mineralização (DECHICHI et al., 2007). A relação entre as fibrilas de colágeno e a porção mineral do dente, no início da mineralização, mostra que os cristais de hidroxiapatita começam a se formar em regiões de lacuna ou anexados às fibrilas de colágeno. Assim, a fibrila de colágeno fornece o arcabouço no qual as proteínas da matriz extracelular podem interagir para iniciar a mineralização (DECHICHI et al., 2007). Desta forma, o uso de materiais que possam interagir com o colágeno dentinário é relevante na busca de opções de tratamento ou proteção frente à erosão dental.

O arcabouço estrutural da dentina, composto pela fração inorgânica e orgânica em conjunto, é crucial para manter a integridade mecânica dos dentes. Observações clínicas mostram vários graus de degradação do colágeno da dentina, dependendo dos anos de função em que o dente se encontra (KISHEN et al., 2016).

Uma superfície de colágeno exposta é um substrato desafiador para a nucleação mineral por causa de sua polaridade e carga superficial fracas. Uma ultraestrutura alterada da dentina afeta as propriedades físico-químicas com a resultante molhabilidade da superfície dentinária comprometida (HASHMI; ZHANG; KISHEN, 2019). É importante ressaltar que as propriedades mecânicas do colágeno em macroescala são altamente dependentes do conteúdo mineral e fase, bem como no arranjo de fibrilas de colágeno em nanoescala (ZHENG et al., 2019).

O colágeno exposto da matriz dentinária decorrente de alguma patologia ou procedimentos iatrogênicos é suscetível à degradação. As proteases originadas de bactérias, e as metaloproteinases de matriz (MMPs) derivada do hospedeiro ou da saliva são conhecidas por degradar o colágeno dentinário com o tempo (KISHEN et al., 2016).

O processo de erosão química da estrutura dental também interfere na integridade da matriz de colágeno da dentina. O pH da solução erosiva aumenta a taxa de progressão da erosão e sua severidade e é o principal preditor das propriedades de desmineralização erosiva de uma solução (DE SIQUEIRA et al., 2020). Além disso, à medida que a erosão continua a progredir, mais fibrilas de colágeno ficam expostas na camada superficial. Esta alteração no substrato gera problemas posteriores como uma dificuldade na infiltração adequada dos monômeros da resina na dentina subjacente, comprometendo a qualidade da adesão da restauração (DE SIQUEIRA et al., 2020).

O colágeno tipo I da dentina desempenha uma série de funções estruturais como suporte para mineralização e viscoelasticidade por formar um biomaterial rígido, forte e que preencha os espaços entre os cristais mineralizados (CASTELLAN et al., 2010). As ligações cruzadas intermoleculares são a base para a estabilidade, tração força e viscoelasticidade das fibrilas de colágeno (CHARULATHA; RAJARAM, 2003). Devido a matriz de colágeno da dentina ser um componente vital da restauração de uma estrutura dentária perdida, uma estrutura de colágeno mais forte e mais estável é desejável para procedimentos restauradores, como restaurações adesivas estéticas (CASTELLAN et al., 2010).

A aplicabilidade de matrizes compostas de colágeno em engenharia de tecidos vem sendo mostrada em estudos envolvendo a remineralização de matriz óssea para melhorar as

propriedades mecânicas e fornecer bioatividade para o enxerto ósseo (JONES et al., 2010; KANE et al., 2015). Entretanto, estudos avaliando a utilização de colágeno em remineralização dental são escassos e relatados apenas em processos de cárie (ABDELSHAFI et al., 2021).

Abdelshafi et al. (2021) em seu estudo, sintetizaram, caracterizaram e avaliaram um nanocompósito de colágeno/hidroxiapatita, aplicado juntamente com um reticulador de colágeno, na tentativa de melhorar a qualidade da estrutura da zona cariada mais profunda e remineralizável da dentina e, posteriormente, aumentar sua resistência de união a materiais resinosos adesivos. Os maiores valores de resistência à microtração das restaurações em resina aplicadas foram encontrados na dentina tratada com colágeno/hidroxiapatita na proporção 30/70% e extrato de semente de uva a 6,5% (reticulador de colágeno) em comparação com os outros grupos, mostrando uma possível significância clínica da associação colágeno/hidroxiapatita.

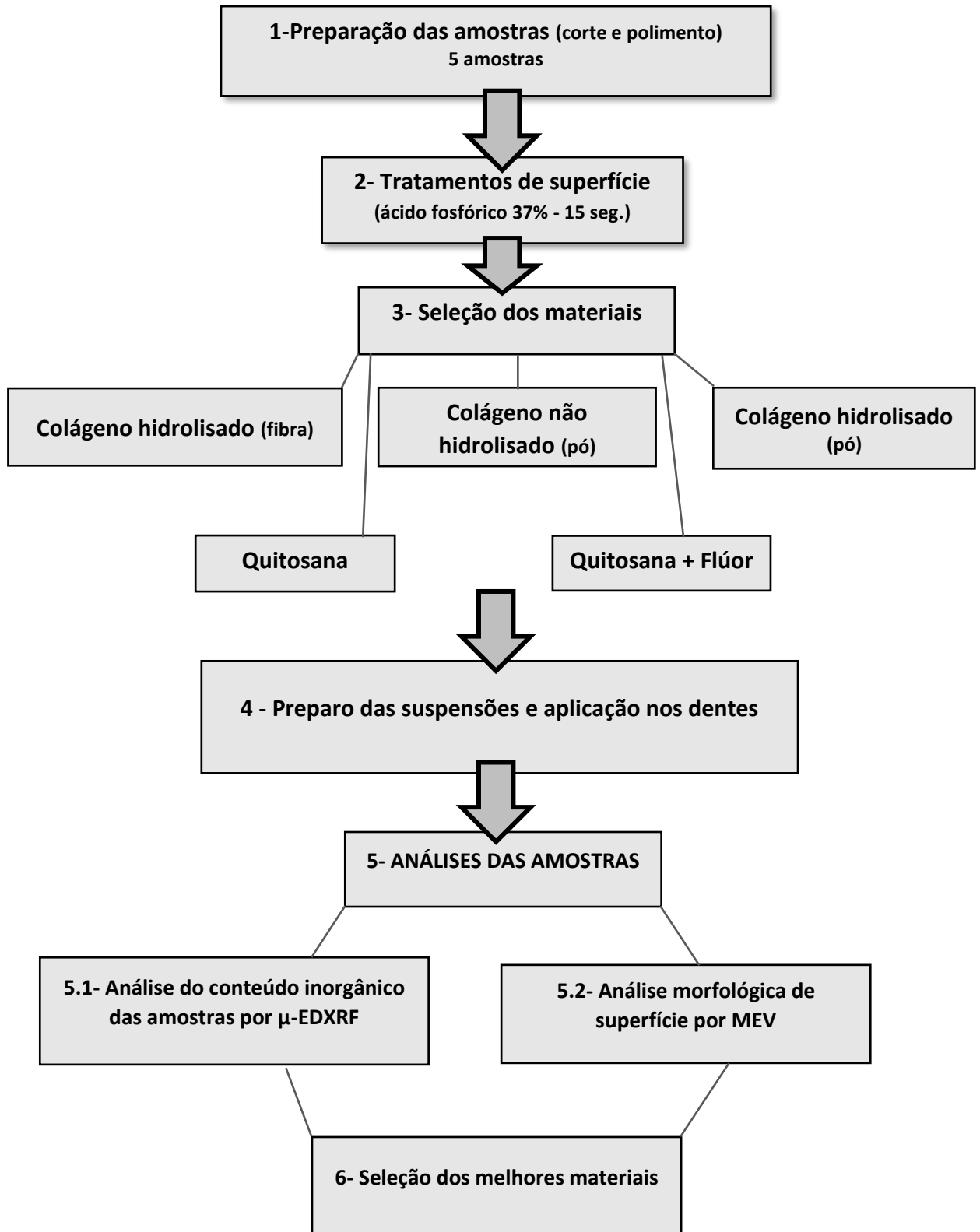
No entanto, com base na literatura revisada, até o momento não foram relatados estudos que aplicaram colágeno em suspensão, associado ou não ao flúor, para tratamento ou proteção da dentina frente a processos de erosão dental.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas etapas: 1) caracterização da aplicação na dentina de materiais compostos de colágeno, quitosana e quitosana associada ao flúor; Seleção dos materiais com melhor cobertura de superfície na dentina radicular bovina desmineralizada; 2) aplicação dos materiais selecionados e avaliação das alterações morfológicas e químicas ocorridas na superfície da dentina radicular tratada com compósitos quitosana-flúor e colágeno-flúor após a erosão quando comparado a aplicação desses materiais individualmente. O procedimento experimental realizado nos dois estudos pode ser visualizado de forma resumida nos Fluxogramas 1 e 2.

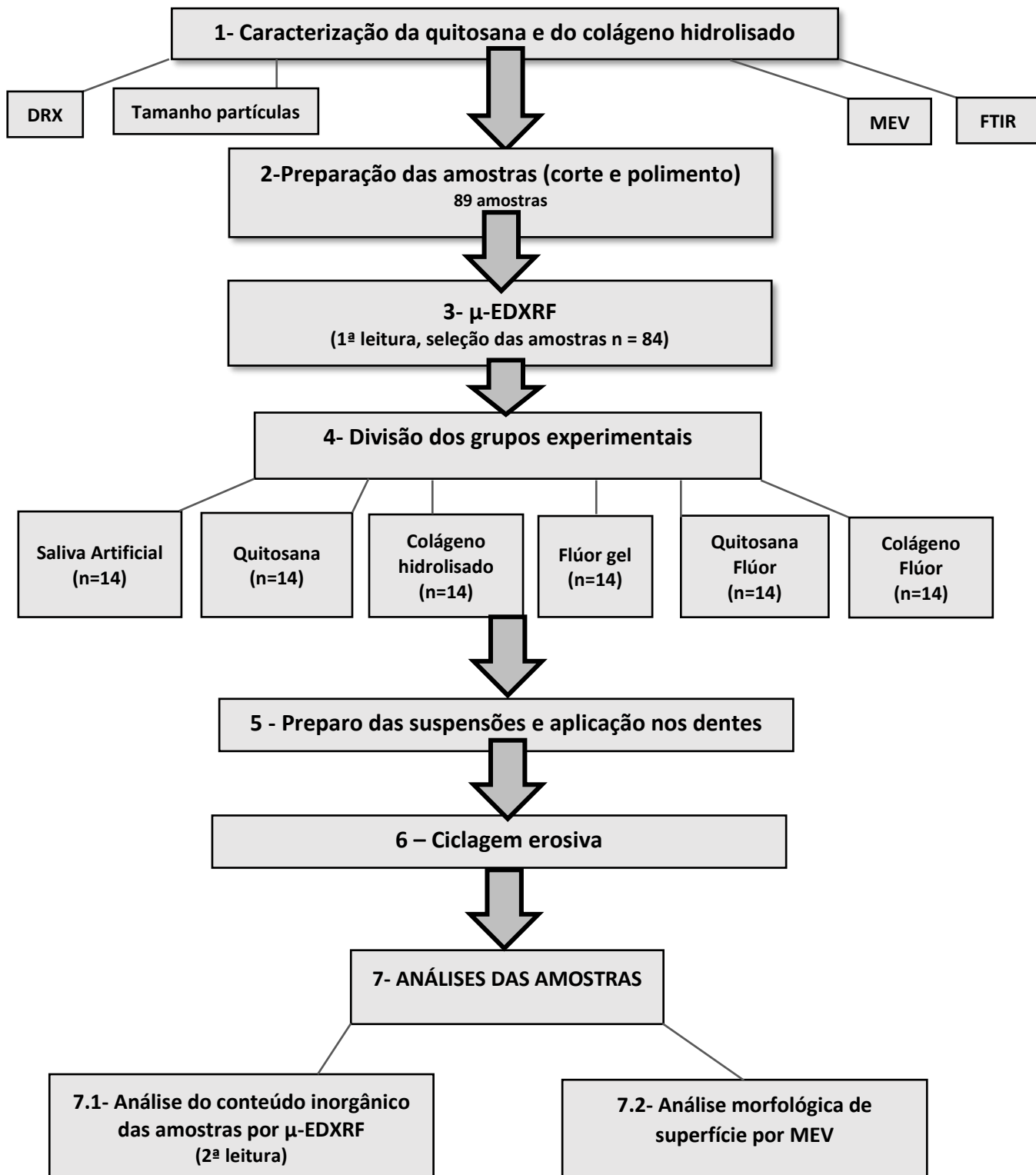
As amostras de dentes bovinos utilizadas neste estudo são amostras de dentina radicular e foram manipuladas após aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), sob número de protocolo A03/CEUA2019 (Anexo A).

Fluxograma 1: Sequência de passos desenvolvidos para teste e seleção dos materiais realizados na etapa 1.



Fonte: Elaborado pelo autor

Fluxograma 2: Sequência de passos para o preparo de amostras, tratamentos, erosão e análise dos biomateriais testados na etapa 2.



Fonte: Elaborado pelo autor

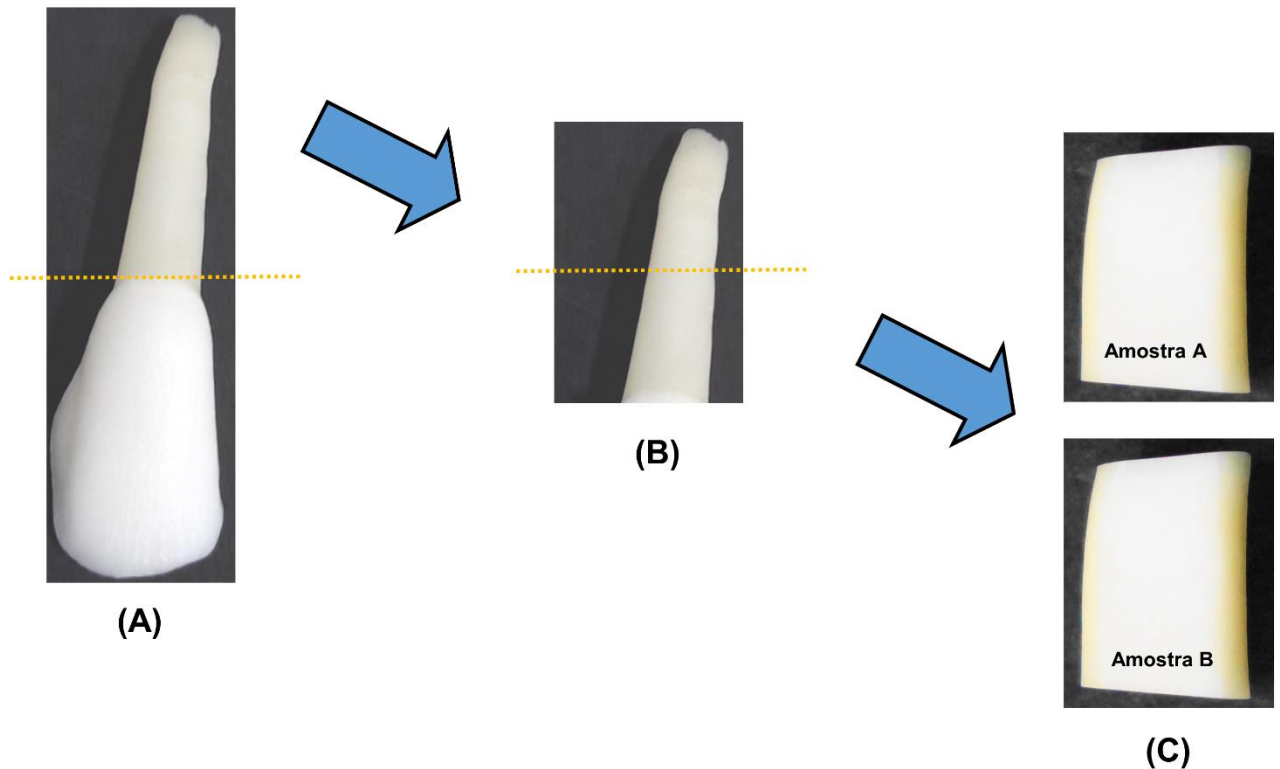
4.1 Etapa 1: Caracterização da aplicação na dentina de materiais compostos de colágeno, quitosana e quitosana associada ao flúor

4.1.1 Preparo das amostras

Para esta primeira parte do estudo, três dentes incisivos bovinos foram selecionados. O uso de dentes bovinos é justificado por sua similaridade com dentes humanos (SOARES; DO ESPÍRITO SANTO, 2015) e utilização em estudos prévios em erosão dental (NAHORNY et al., 2017; GOMES et al., 2018; AINOOSAH et al., 2020; SARIALIOGLU GUNGOR; DONMEZ, 2021)

Em um primeiro corte, as amostras foram seccionadas na junção amelocementária separando as coroas das raízes (Esquema 1A). Para este corte foi utilizando um disco diamantado (serie 15HC 11-4244, Buehler[®], Lake Bluff, IL, EUA) montado em máquina de corte (IsoMet 1000 Buehler[®]). Na sequência, um segundo corte foi realizado na amostra de dentina radicular (Esquema 1B), dividindo assim a raiz em duas partes (fragmentos A e B) (Esquema 1C). As superfícies de dentina dos blocos obtidos (n = 5, tamanho de 8 mm de comprimento, 8 mm de largura e 6 mm de espessura) foram planificadas e polidas em um politriz (Metaserv 2000, Buehler[®]) refrigerada a água com lixas d'água de granulação nº 600 e 1200 (Arotec, Cotia, SP, Brasil) por 10 segundos cada lixa. Ao final do uso de cada lixa, as amostras foram lavadas com água por 10 segundos em cuba de ultrassom (Lavadora Maxiclean 1450, Merse, Campinas, SP, Brasil).

Esquema 1: Esquema ilustrativo das etapas de corte dos dentes bovinos: secção na junção amelocementária (1º corte) (A), obtenção das amostras de dentina radicular (B) e secção da raiz em duas partes (2º corte) (C).



Fonte: Elaborado pelo

4.1.2 Tratamentos de superfície, preparo das suspensões contendo biomateriais e aplicação na estrutura dental

A superfície da dentina foi tratada com ácido fosfórico 37% (CONDAC 37, FGM, Joinville, SC, Brasil) por 15 segundos (Fotografia 1), limpa com água destilada por 30 segundos e seca com papel absorvente para simular uma superfície desmineralizada por erosão e também para aumentar a energia de superfície da dentina (NAHORNÝ et al., 2017). A aplicação prévia do condicionamento químico pelo ácido fosfórico em forma de gel justifica-se por possibilitar o maior controle da área de aplicação (DOS SANTOS FILHO et al., 2021).

Para realizar o tratamento de superfície da dentina foram selecionados três tipos de colágeno de origem bovina (proteína de origem animal) (Novapro® Hidro – *Novaprom Food Ingredients*, Guaiçara, SP, Brasil), uma quitosana em pó (Polymar®, Polymar Ind. Com. Imp. E Exp. Ltda, Fortaleza, CE, Brasil) e ainda foi preparado um composto de suspensão de quitosana e flúor gel (Tabela 1). Para o preparo das suspensões, os materiais foram pesados em balança analítica (SHIMADZU, AYU 220, Japão) e diluídos em água destilada.

Fotografia 1: Seringa de ácido fosfórico em gel utilizada para condicionamento da dentina (A), blocos de dentina com ácido fosfórico em gel (B).



Fonte: Elaborado pelo

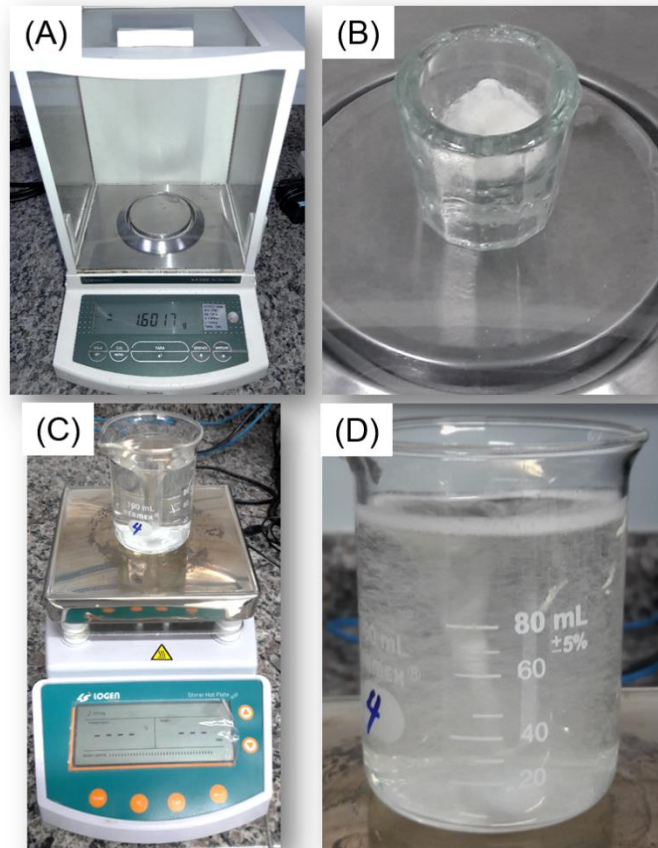
Tabela 1: Grupos experimentais do estudo 1.

Grupos	Material	Apresentação	Fabricante
HF_Col	Colágeno hidrolisado	Fibras	
NH_Col	Colágeno não-hidrolisado	Pó	Col-H, tipo I, JBS
H_Col	Colágeno hidrolisado	Pó	
Chi	Quitosana	Pó	Polymar [®]
Chi_F	Quitosana + flúor	Suspensão	Composto preparado

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para preparar a suspensão de quitosana e colágeno (9,1%), 5 g de quitosana (Polymar[®]) ou dos materiais de colágeno (Novapro[®] Hidro) foram adicionados lentamente a 50 mL de água destilada sob agitação contínua (Stirrer Hot Plate 400, LOGEN Scientific, Alpax, Diadema, SP, Brasil) por 10 min (tempo suficiente para solubilizar os pós) (Fotografia 2). A composição com flúor foi preparada diluindo 40 mL de água destilada e 5 g de quitosana (Polymar[®]), agitando continuamente por 10 min. Em seguida, 10 mL de flúor fosfato acidulado em gel (1.23% fluoreto de sódio NaF, DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram lentamente incorporados à suspensão sob agitação contínua por mais 10 min.

Fotografia 2: Esquema representando as etapas de preparo das suspensões: balança de precisão utilizada na pesagem dos materiais (A), amostra sendo pesada (B) diluição dos materiais em agitador magnético (C, D).



Fonte: Elaborado pelo

Fotografia 3: Suspensões obtidas com os materiais: colágeno hidrolisado fibras (1), colágeno não-hidrolisado pó (2), colágeno hidrolisado pó (3), quitosana pó (4) e quitosana + flúor gel (5).



Fonte: Elaborado pelo

As cinco suspensões preparadas (Fotografia 3) foram aplicadas imergindo os blocos de dentina em frascos plásticos contendo 3 ml das respectivas suspensões. As suspensões foram mantidas em contato com a dentina por 5 horas, sob agitação em agitador magnético (75 rpm, modelo 752A, FISATOM), como tratamento de superfície. Ao final desta etapa do tratamento, as amostras foram caracterizadas por meio de análise morfológica e composicional.

4.1.3 Análise do conteúdo inorgânico das amostras por μ -EDXRF

A análise composicional foi realizada utilizando o sistema de espectrometria de fluorescência de raios X por microenergia dispersiva (μ -EDXRF, modelo μ -EDX 1300, Shimadzu, Kyoto, Japão) (Fotografia 4). Os mapas da área de distribuição elementar ($n = 5$) foram obtidos com os seguintes parâmetros: 20×20 pontos; passos de $20 \mu\text{m}$; tensão, 15 kV; diâmetro do feixe incidente, $50 \mu\text{m}$. Os dados obtidos e as imagens resultantes dos mapeamentos das áreas foram processados no software do sistema (NAHÓRNY; DE OLIVEIRA; SOARES, 2021).

Fotografia 4: Fotografia do equipamento de μ -EDXRF utilizado no experimento.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.1.4 Análise morfológica de superfície por MEV

As amostras de dentina foram desidratadas usando uma série graduada de etanol (30%, 50%, 70%, 95% e 100%) por 10 minutos em cada estágio. Em seguida, foram secas e metalizadas com uma camada de ouro e avaliadas por MEV (EVO-MA10, Carl STM Zeiss, Oberkochen, Alemanha) (Fotografia 5) (NAHORNÝ et al., 2017; SOARES et al., 2020; NAHORNÝ; DE OLIVEIRA; SOARES, 2021).

Fotografia 5: Fotografia do equipamento de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizado no experimento.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Etapa 2: Aplicação dos materiais selecionados e avaliação das alterações ocorridas na superfície da dentina após a erosão

4.2.1 Caracterização da quitosana e do colágeno hidrolisado

Os materiais utilizados nesta etapa do estudo foram a quitosana e o colágeno bovino hidrolisado (Tabela I).

Os materiais utilizados foram caracterizados quanto à morfologia das partículas por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura (EVO MA10, Carl Zeiss VR STM,

Oberkochen, BW, Alemanha) onde as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas por uma tensão de 5 kV e análise de elétrons retroespalhados. Quanto às fases cristalinas os materiais foram avaliados por meio da técnica de difração de raios X (XRD-6000, Shimadzu, Japão), empregando-se radiação Cu-K α ($\lambda= 1,54439 \text{ \AA}$) com varredura 2θ de 10 a 800 usando fenda 1.0.

Quanto à distribuição de tamanho de partículas os materiais utilizados foram classificados usando um analisador de tamanho de partículas (S3550, Microtrac). Após determinados os índices de refração das amostras, realizou-se a dispersão de 50 mg de cada material em 50 ml de álcool isopropílico e submeteu-se ao ultrassom (Sonics Vibra-cell, modelo VCX 500) por 15 minutos. Em relação aos grupos químicos característicos das amostras, a caracterização dos biomateriais foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram medidos usando um espectrômetro de infravermelho (Perkin Elmer, Spectrum 400), resolução de 4cm^{-1} , em um intervalo de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.2.2 Preparo das amostras de dentes bovinos

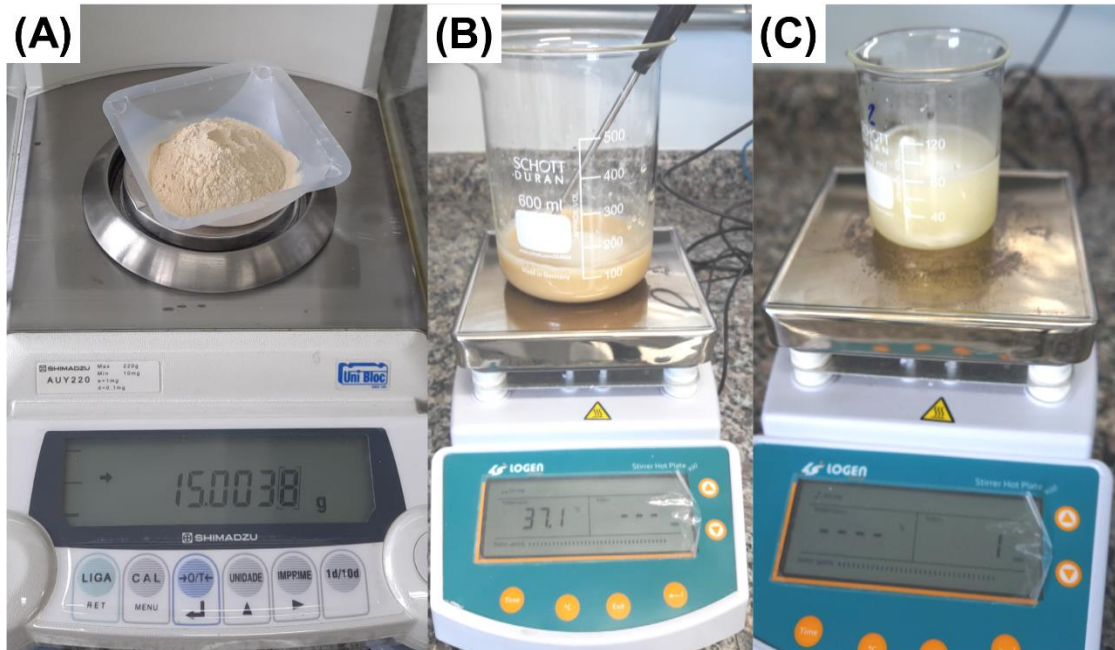
Para esta segunda parte do estudo, os materiais quitosana e colágeno hidrolisado testados na primeira etapa foram selecionados para aplicação na dentina. Cinquenta dentes incisivos bovinos foram selecionados e preparados como mostrado anteriormente na Figura 3. De um total de 100 amostras obtidas, 89 amostras foram selecionadas com base em suas dimensões, comprimento da raiz, similaridades na morfologia e ausência de trincas.

4.2.3 Preparo das suspensões contendo biomateriais

Para preparar a suspensão de quitosana e colágeno (13,04%), 15 g de pó de quitosana ou colágeno hidrolisado foram adicionados lentamente a 100 mL de água destilada sob agitação contínua (Stirrer Hot Plate 400, LOGEN Scientific, Alpax, Diadema, SP, Brasil) por 10 min (tempo suficiente para solubilizar os pós) (Fotografia 6).

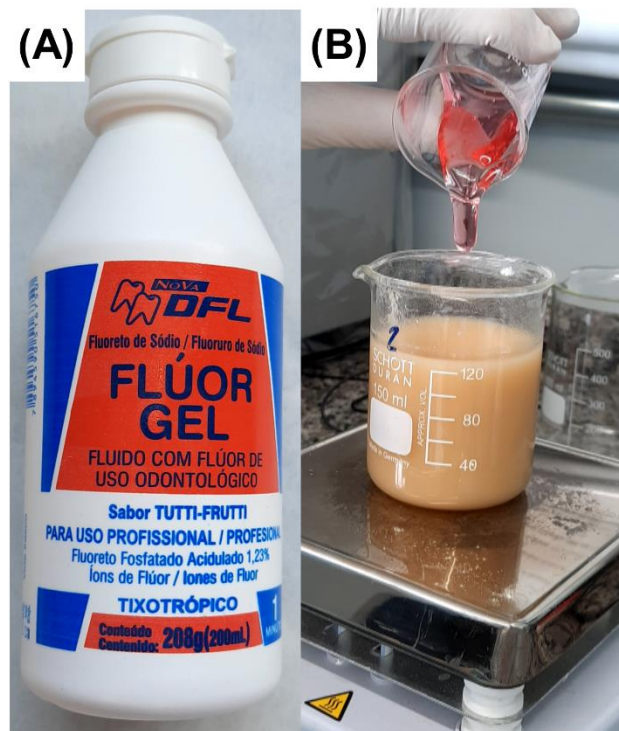
As composições de fluoreto foram preparadas diluindo 100 mL de água destilada, 10 g de quitosana ou pó de colágeno hidrolisado, agitando continuamente por 10 min. Em seguida, 10 mL de flúor fosfato acidulado em gel foram lentamente incorporados à suspensão sob agitação contínua por mais 10 min (Fotografia 7).

Fotografia 6: Sequência de preparo das suspensões contendo os biomateriais: pesagem (A) preparo da suspensão de quitosana (B) e colágeno (C).



Fonte: Elaborado pelo autor

Fotografia 7: Figura esquemática da preparação da composição com flúor: flúor gel utilizado (A), diluição do flúor gel na suspensão de quitosana ou colágeno (B).



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.4 Análise inicial do conteúdo inorgânico e seleção das amostras por μ -EDXRF

O conteúdo inorgânico das amostras de dentina foi medido antes (primeira análise) e após os tratamentos de superfície (segunda análise). A primeira coleta de dados foi realizada para selecionar amostras com conteúdo inorgânico homogêneo e realizar a divisão dos grupos experimentais. A composição inorgânica de 89 amostras de dentina foi medida por μ -EDXRF (modelo μ -EDX 1300, Shimadzu, Kyoto, Japão). As percentagens em peso (% em peso) do conteúdo de cálcio (Ca) e fósforo (P) da dentina foram medidas por mapeamento de superfície em linha (n = 89) (primeira análise).

Os mapeamentos em linha cobriram uma linha central selecionada de 300×1 pontos (passos de 20 μ m, 10 s por ponto, 15 kV). Após o mapeamento e processamento dos dados, foram excluídas cinco amostras com valores abaixo ou acima do teor médio de cálcio ($22,91 \pm 0,85\%$). A seguir, a análise estatística dos resultados desta primeira análise foi realizada por meio do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego CA, EUA). O tamanho da amostra necessária para o estudo foi baseado em estudos anteriores do nosso grupo e após cálculo no software G*Power (G*Power v. 3.1.9.2, Franz Faul, Universidade de Kiel, Kiel, Alemanha) usando uma análise de variância (ANOVA; medidas repetidas, interação intra e entre grupos).

As 84 amostras de dentina radicular selecionadas foram alocadas aleatoriamente em seis grupos de 14 amostras cada (Tabela 2). As amostras de dentina foram distribuídas nos seguintes grupos experimentais: saliva artificial (AS - sem proteção, controle negativo), flúor fosfato acidulado em gel (F- controle positivo), quitosana (Chi), colágeno hidrolisado (Col), composição de flúor/quitosana (F_Chi) e composição de flúor/colágeno hidrolisado (F_Col).

Tabela 2: Descrição das etapas de análise, número de amostras e técnicas analíticas usadas para os grupos experimentais e controle (positivo e negativo).

GRUPOS EXPERIMENTAIS		Após preparação	Após tratamentos/erosão
Amostras: Dentina (n = 100) ↓ Corte/polimento ↓ Amostras para análise: Dentina (n = 100, excluídas 16, n = 84) ↓ Seleção conteúdo inorgânico μ -EDXRF ↓ (n = 84) ↓ Divisão em 6 grupos 14 amostras	Sem flúor (n = 42)	<i>Controle negativo:</i> Saliva artificial (AS) (n = 14)	1ª μ -EDXRF (n = 14) ↓ MEV (n = 2)
		Quitosana (Chi) (n = 14)	1ª μ -EDXRF (n = 14) ↓ MEV (n = 2)
		Colágeno hidrolisado (Col) (n = 14)	1ª μ -EDXRF (n = 14) ↓ MEV (n = 2)
	Com flúor (n = 42)	<i>Controle positivo:</i> Flúor fosfato acidulado gel (F) (n = 14)	1ª μ -EDXRF (n = 14) ↓ MEV (n = 2)
		Flúor/quitosana (F_Chi) (n = 14)	1ª μ -EDXRF (n = 14) ↓ MEV (n = 2)
		Flúor/colágeno (F_Col) (n = 14)	1ª μ -EDXRF (n = 14) ↓ MEV (n = 2)

Ferramentas analíticas: μ -EDXRF (seleção de amostras e após tratamentos / erosão) e MEV (caracterização morfológica).

Fonte: Elaborado pelo autor.

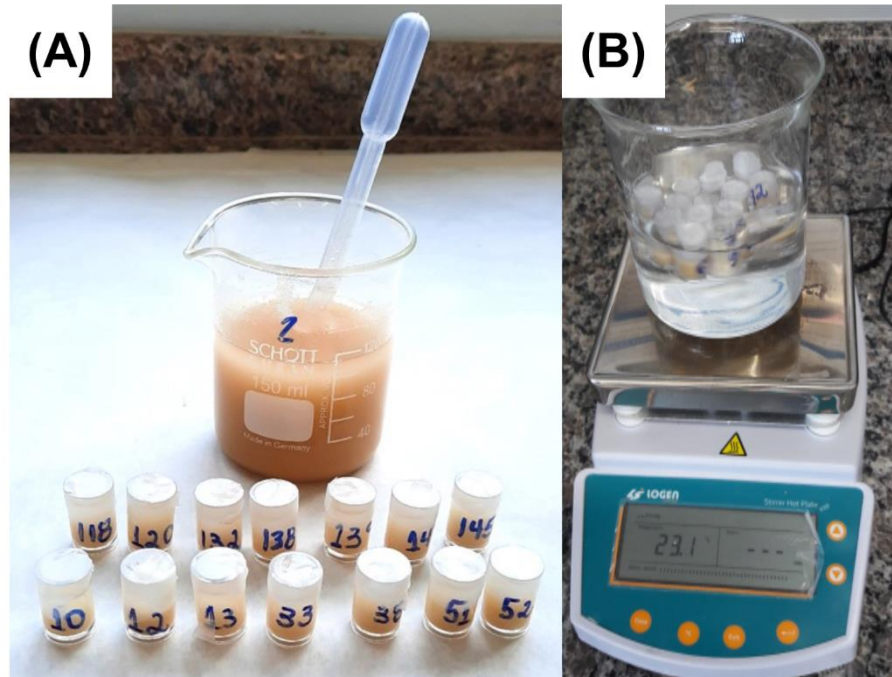
4.2.5 Aplicação dos tratamentos de superfície

As superfícies de todas as amostras selecionadas (n = 84) receberam inicialmente um condicionamento com ácido fosfórico 37% (CONDAC 37, FGM, Joinville, SC, Brasil) por 15 segundos. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada por 30 segundos e secas com papel absorvente (URURAHY et al., 2017). Este procedimento de condicionamento de superfície preparou a dentina para o tratamento com os biomateriais selecionados, pois o condicionamento expõe as fibras de colágeno superficiais da dentina e permite a interação com o biomaterial (NAHORNY et al., 2017; SOARES et al., 2020; NAHÓRNY; DE OLIVEIRA; SOARES, 2021).

Cada amostra de dentina do grupo AS (controle negativo) foi armazenada individualmente em frascos plásticos contendo 3 mL de saliva artificial e incubada estaticamente por 1 h (37° C) em estufa (SX 300 DTME, STERILIFER, Diadema, SP, Brasil). Ao final deste processo a saliva foi removida por um enxágue com água destilada por 30 segundos.

As amostras do grupo F (controle positivo) receberam uma aplicação prévia de flúor fosfato acidulado em gel (1,23% fluoreto de sódio NaF, DFL Indústria e Comércio SA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 1 min, sendo o excesso de material removido com gaze. Em seguida, para simular um protocolo clínico, as amostras foram lavadas com água destilada por 10 s após um intervalo de 30 min (conforme instruções do fabricante) (WANG et al., 2018). A seguir, cada amostra de dentina dos grupos Chi, Col, F_Chi e F_Col foi armazenada individualmente em frascos plásticos com 3 mL da suspensão ou composição dispersa (de acordo com a divisão do grupo) sob agitação suave (75 rpm) por 1 h (Fotografia 8). Após um intervalo de descanso de 10 min, o material / composição dispersa foi renovado e as amostras foram submetidas novamente a 1 h de agitação.

Fotografia 8: Amostras armazenadas individualmente em frascos plásticos com 3 mL da suspensão ou composição dispersa (de acordo com a divisão do grupo) (A) e agitação dos frascos por 1 h (B).

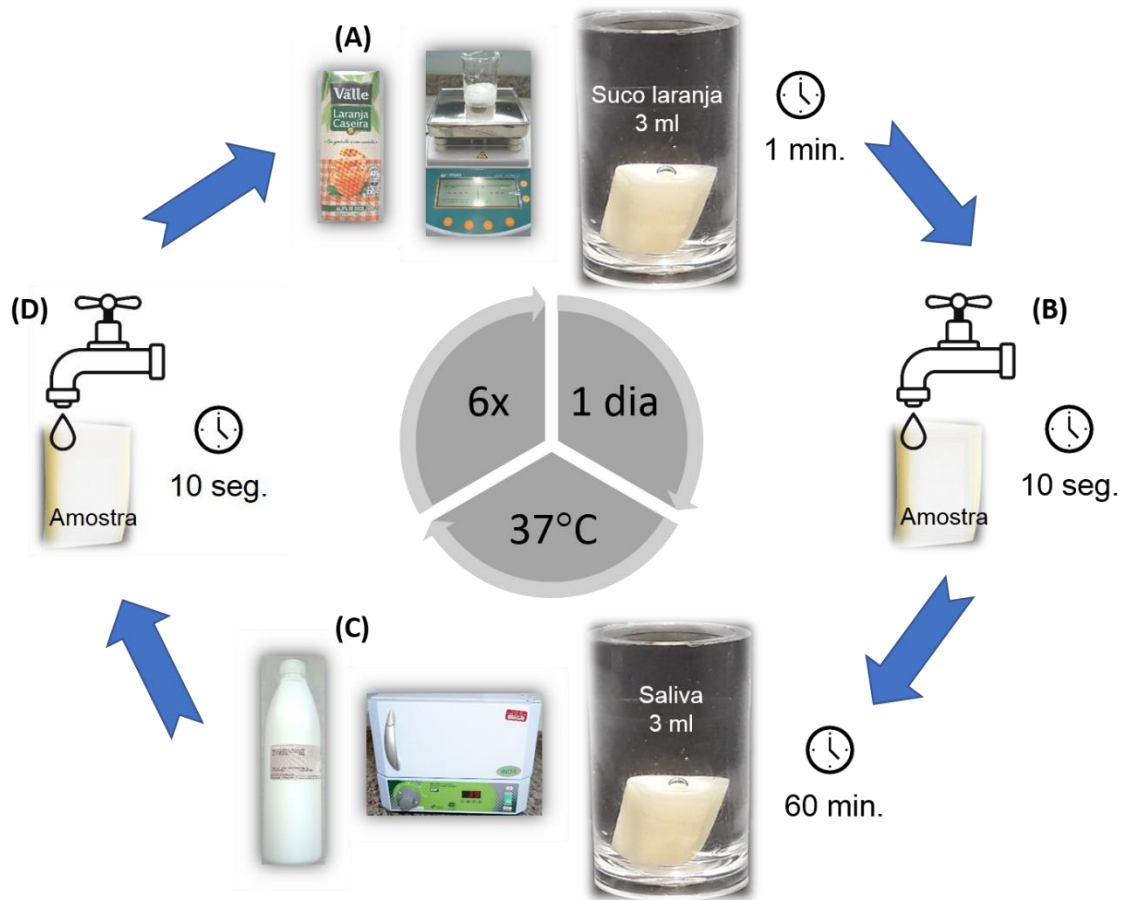


Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.6 Realização dos ciclos erosivos

As amostras tratadas foram então submetidas a seis ciclos erosivos consecutivos em suco de laranja (desmineralização) e saliva artificial (remineralização) (Esquema 2) (NAHORNY et al., 2017). O procedimento de desmineralização de cada grupo foi realizado em um dia imergindo cada amostra em 3 mL de suco de laranja (Minute Maid Mais Laranja Caseira, suco natural 67%, pH ~ 3,67) sob agitação por 1 min, seguido de lavagem com água destilada por 10 segundos. A remineralização foi realizada em saliva artificial (3 mL, 1 h, 37 ° C, estufa de cultura, SX 300 DTME, Sterilifer, Diadema, SP, Brasil). Ao final da ciclagem de pH, as amostras foram lavadas com água destilada para a realização das análises química e morfológica (Esquema 2).

Esquema 2: Esquema representativo da ciclagem erosiva realizada nas amostras de dentina: desmineralização (A), lavagem intermediária (B), remineralização (C) e lavagem ao final do ciclo (D).



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.7 Análise final do conteúdo inorgânico e seleção das amostras por μ -EDXRF

Após a aplicação dos tratamentos de superfície e realização dos ciclos erosivos, mapeamentos em linha por μ -EDXRF (segunda análise) foram realizados usando parâmetros iguais das primeiras medições ($n = 84$). Em uma amostra representativa de cada grupo, um mapeamento em área avaliou a superfície da dentina para obter uma distribuição elementar dos componentes inorgânicos ($n = 6$). Os parâmetros utilizados foram: 40×30 pontos; passos de $20 \mu\text{m}$; tensão, 15 kV ; diâmetro do feixe incidente, $50 \mu\text{m}$. O software do equipamento processou os dados obtidos para cada amostra (Shimadzu microEDX MP ver. 1.03, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão).

4.2.8 Análise da morfologia de superfície por MEV

Após a aplicação dos tratamentos de superfície e dos ciclos erosivos, duas amostras de dentina representativas foram selecionadas para cada grupo e preparadas para uma investigação morfológica detalhada. As amostras (n = 12) foram desidratadas por uma série graduada de etanol (50%, 70%, 90% e 100%) por 10 min em cada etapa. Em seguida, as amostras foram secas a 37 ° C por 24 h e mantidas em dessecador a vácuo com sílica gel por mais 72 h (GOMES et al., 2019). Em seguida, as amostras receberam uma fina camada de ouro (10 nm) e foram examinadas em MEV (EVO-MA10, Carl Zeiss VR STM, Oberkochen, BW, Alemanha) com uma tensão de aceleração de 20 kV (NAHORNY et al., 2017; GOMES et al., 2019; SOARES et al., 2020; NAHÓRNY; DE OLIVEIRA; SOARES, 2021).

4.2.9 Análise estatística

Após a realização dos mapeamentos em linha sobre a dentina (1ª e 2ª leituras), os mapeamentos em área (2ª leitura), correspondentes a cada amostra foram tratados por um processo de filtragem (*smoothing*) de cinco pontos utilizando o software do sistema do μ -EDXRF e em seguida os valores da concentração em peso dos componentes cálcio e fósforo (médio) na região delimitada foram anotados e tabulados numa planilha no programa Excel para efetuar os cálculos estatísticos. Também foi tabulada a relação Ca/P para cada grupo.

As imagens da distribuição química dos componentes cálcio e fósforo obtidas por μ -EDXRF (linha e área), representativas de cada grupo, para cada período de análise (1ª e 2ª leituras) foram separadas para a montagem das figuras esquemáticas comparativas com mesma escala de base.

As porcentagens de cálcio e fósforo (% em peso) e as razões molares cálcio/fósforo foram analisadas estatisticamente no programa GraphPad Prism (versão 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Todas as comparações estatísticas foram realizadas com nível de significância $\alpha = 0,05$, com intervalos de confiança de 95%. Foi realizado um teste ANOVA unilateral com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni para comparar os dados iniciais e finais. Diferenças estatísticas significativas entre o controle (negativo e positivo) e outros grupos foram avaliadas usando o teste de comparações múltiplas de Dunnett.

5 RESULTADOS

Esta seção descreve separadamente os resultados obtidos após a realização das análises específicas das etapas 1 e 2 deste estudo.

5.1 Resultados da Etapa 1

Os dados obtidos no mapeamento da superfície dentinária indicaram que o recobrimento com os materiais H_Col e Chi_F resultou no menor desvio padrão e coeficiente de variância na concentração dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) (Tabela 3). A homogeneidade do conteúdo de Ca e P na dentina foi observada na ordem Chi_F > H_Col > Chi > HF_Col > NH_Col.

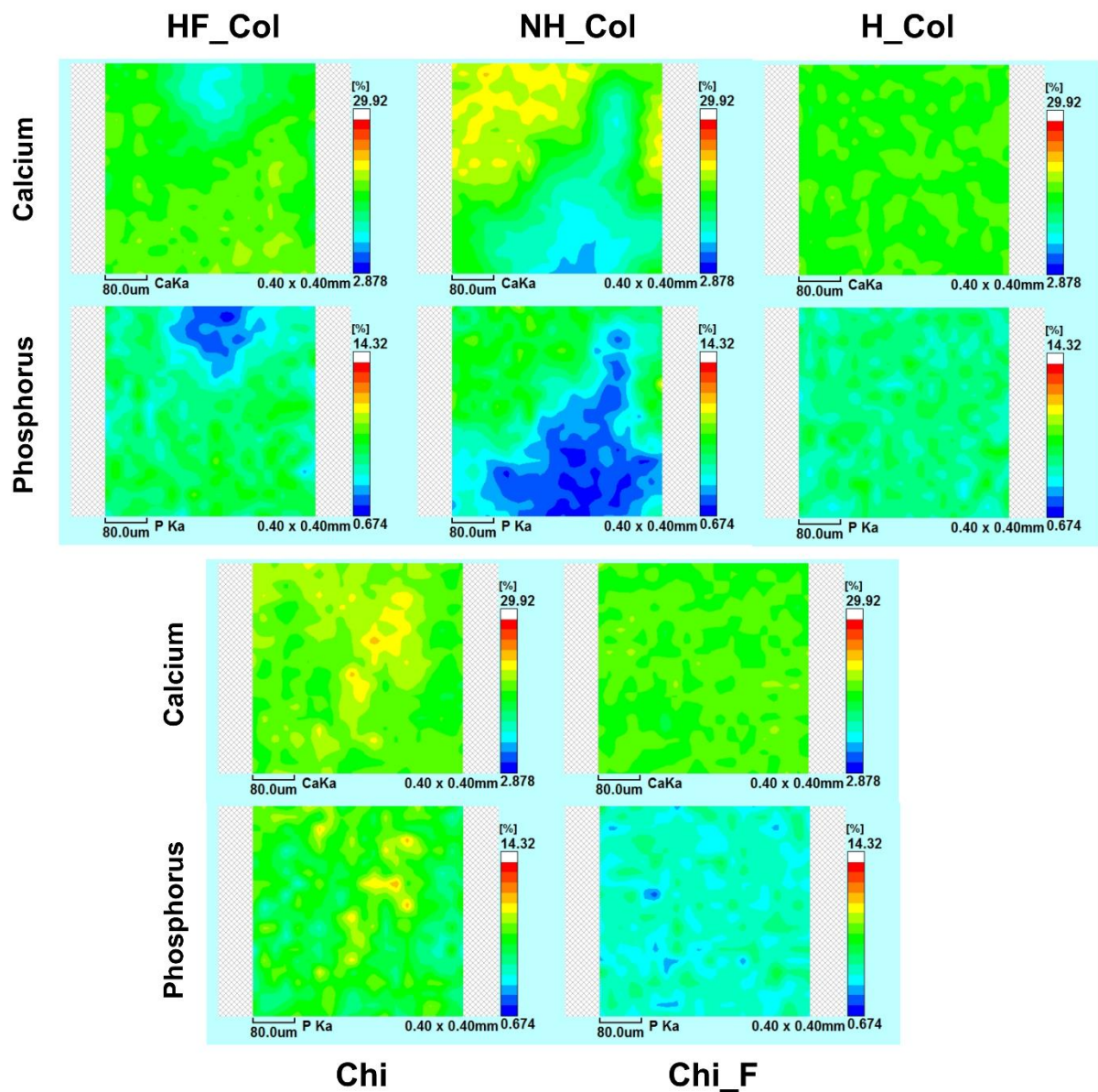
Tabela 3: Resultados obtidos pelo mapeamento em área por μ -EDXRF, após o tratamento da superfície dentinária com biomateriais. Valores máximo, mínimo, média, desvio padrão (D.P.) e coeficiente de variação (C.V.) das porcentagens (% -peso) de cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície da dentina.

Cálcio	Máximo	Mínimo	Médio	D.P.	C.V.
HF_Col	19.47	9.10	15.61	2.06	13.18
NH_Col	21.76	6.61	14.94	3.92	26.21
H_Col	18.70	14.38	16.21	0.56	3.44
Chi	22.16	13.92	17.59	1.30	7.40
Chi_F	19.68	13.71	16.56	0.61	3.68
Fósforo	Máximo	Mínimo	Médio	D.P.	C.V.
HF_Col	7.99	0.67	5.20	1.18	22.63
NH_Col	9.72	0.76	4.28	1.90	44.40
H_Col	7.46	3.51	5.31	0.54	10.17
Chi	10.80	3.81	6.88	0.98	14.22
Chi_F	6.94	2.01	4.38	0.48	11.04

Fonte: Nahórny *et al.*, (2021).

As imagens da distribuição química dos elementos cálcio e fósforo na superfície dentinária após os tratamentos ilustraram diferentes padrões de interação com a dentina para os grupos colágeno e quitosana (Fotografia 9). O gradiente na intensidade da escala de cores indica variações no conteúdo de Ca de forma que locais com alto conteúdo mineral são representados nas cores amarelo e laranja, enquanto locais com baixo conteúdo mineral são mostrados em tons de verde e azul.

Fotografia 9: Imagens representativas da distribuição de cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície da dentina obtidas por microanálise μ -EDXRF dos tratamentos: HF_Col, NH_Col, H_Col, Chi e Chi_F. As diferentes cores representam as intensidades dos componentes Ca e P e sua distribuição na superfície dentinária.



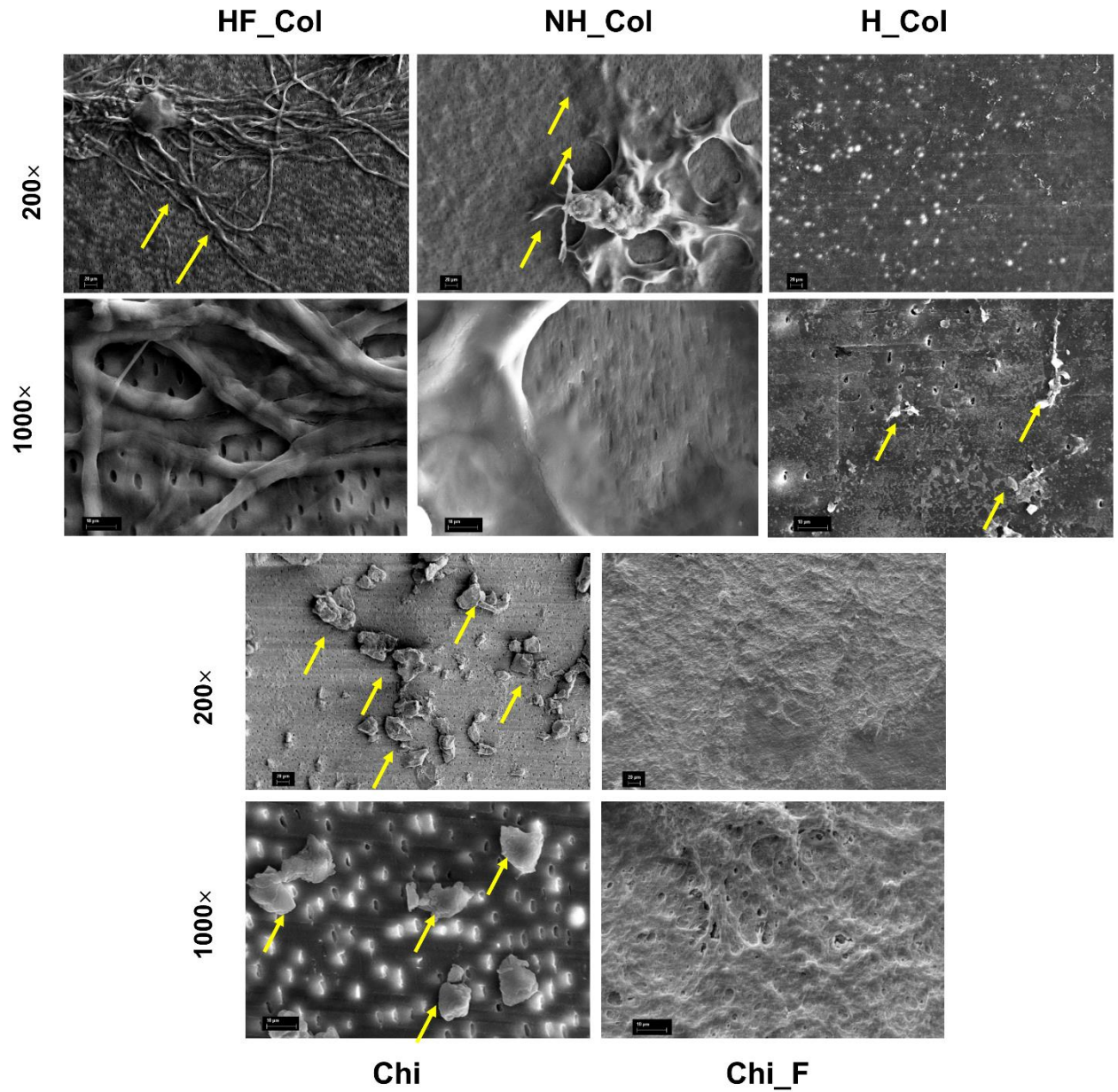
Fonte: Nahórny *et al.*, (2021).

Dentre os tratamentos com colágeno, o que apresentou distribuição mais homogênea foi na amostra de dentina tratada com colágeno hidrolisado (Fotografia 9). Para os grupos tratados com quitosana, o tratamento Chi_F apresentou a melhor distribuição do material na superfície (Fotografia 9).

No grupo HF_Col, as fibras de colágeno aderiram à superfície, cobrindo parcialmente os túbulos dentinários em uma disposição heterogênea (Fotografia 10, setas). A aplicação do material NH_Col resultou na deposição de uma camada de colágeno mais aderida e com maior obliteração da entrada dos túbulos dentinários (Fotografia 10, setas) do que no grupo HF_Col (Fotografia 10). A micrografia da superfície dentinária no grupo H_Col mostra a entrada dos túbulos dentinários parcialmente obstruídos por depósitos de colágeno (Fotografia 10, setas) cobrindo a superfície de maneira mais uniforme do que os outros materiais de colágeno.

No grupo Chi, a quitosana cobriu irregularmente a dentina com depósitos que obstruíram parcialmente a entrada dos túbulos dentinários (Fotografia 10, setas). No grupo Chi_F, o material cobriu completamente a superfície dentinária sem qualquer exposição dos túbulos dentinários (Fotografia 10).

Fotografia 10: Microscopias eletrônicas de varredura representativas ilustrando as diferenças no padrão morfológico da superfície da dentina produzida pelos materiais de colágeno e quitosana (ampliação: 200 e 1000×). Amostra tratada com HF_Col, NH_Col, H_Col, Chi e Chi_F. As setas amarelas indicam depósitos de colágeno ou quitosana nos respectivos grupos. Barra de ampliação: 20 μm em 200× e 10 μm em 1000×.

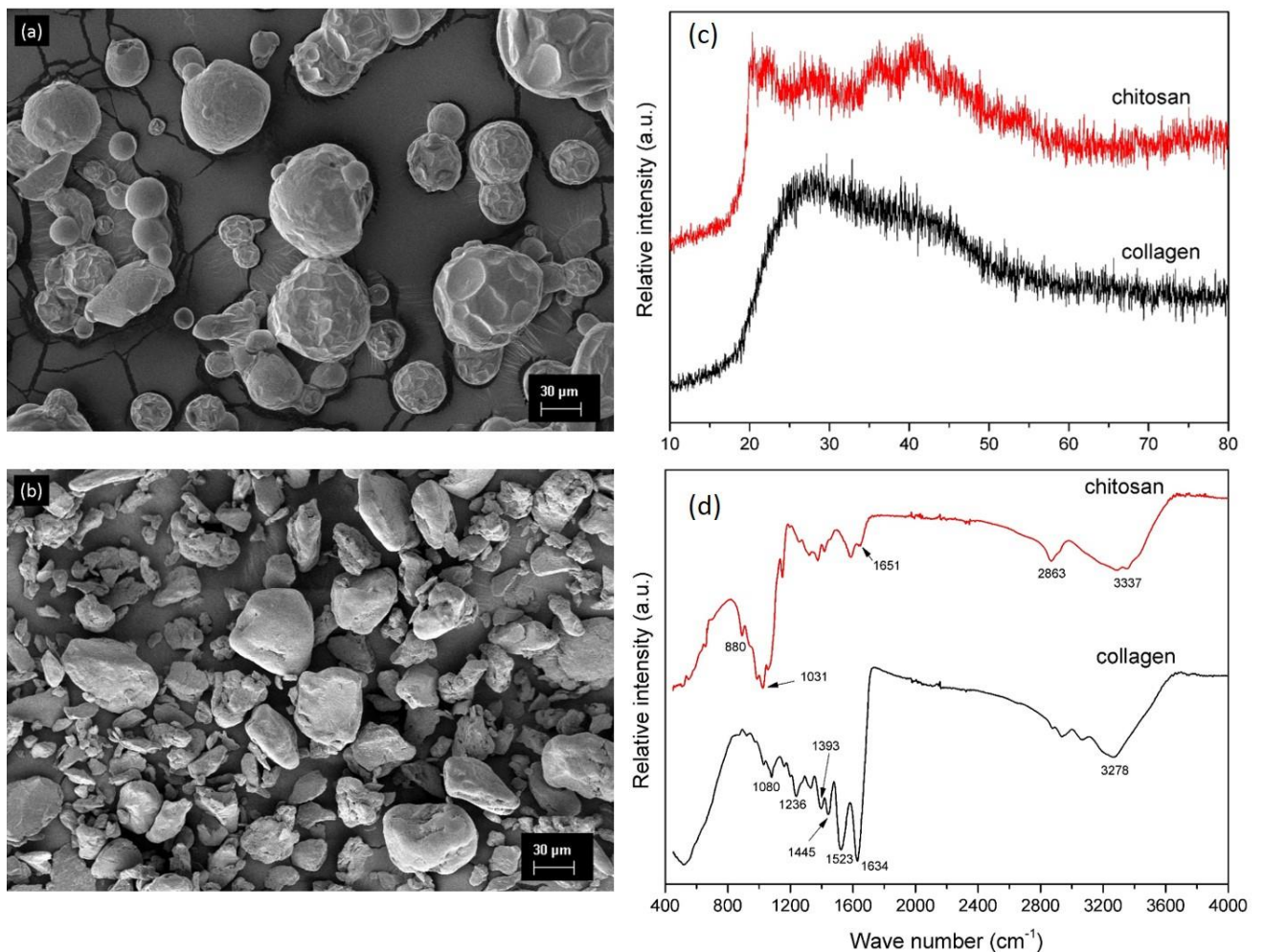


Fonte: Nahorny *et al.*, (2021).

5.2 Resultados da Etapa 2

As micrografias MEV obtidas das partículas do pó de colágeno hidrolisado mostraram uma morfologia mais regular e características esféricas (Fotografia 11a) quando comparado com a quitosana (Fotografia 11b) com um diâmetro médio de partícula maior (80 μm vs. 50 μm). Devido à sua natureza orgânica, a quitosana e o colágeno hidrolisado apresentam apenas um padrão amorfo por análises de XRD, conforme mostrado na Fotografia 11c. As análises de caracterização realizadas no presente estudo dos pós de quitosana e colágeno hidrolisado (Fotografia 11, Tabela 4) mostraram que esses materiais são altamente puros e contêm apenas carbono e oxigênio. Os grupos químicos característicos dos materiais foram identificados por FTIR, conforme apresentado na Fotografia 11d e resumido na Tabela 4.

Fotografia 11: Microscopia eletrônica de varredura do colágeno hidrolisado Col-H (a), da quitosana (b), padrões de XRD dos materiais (c) e análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (d).



Fonte: Nahórny *et al.*, (2021).

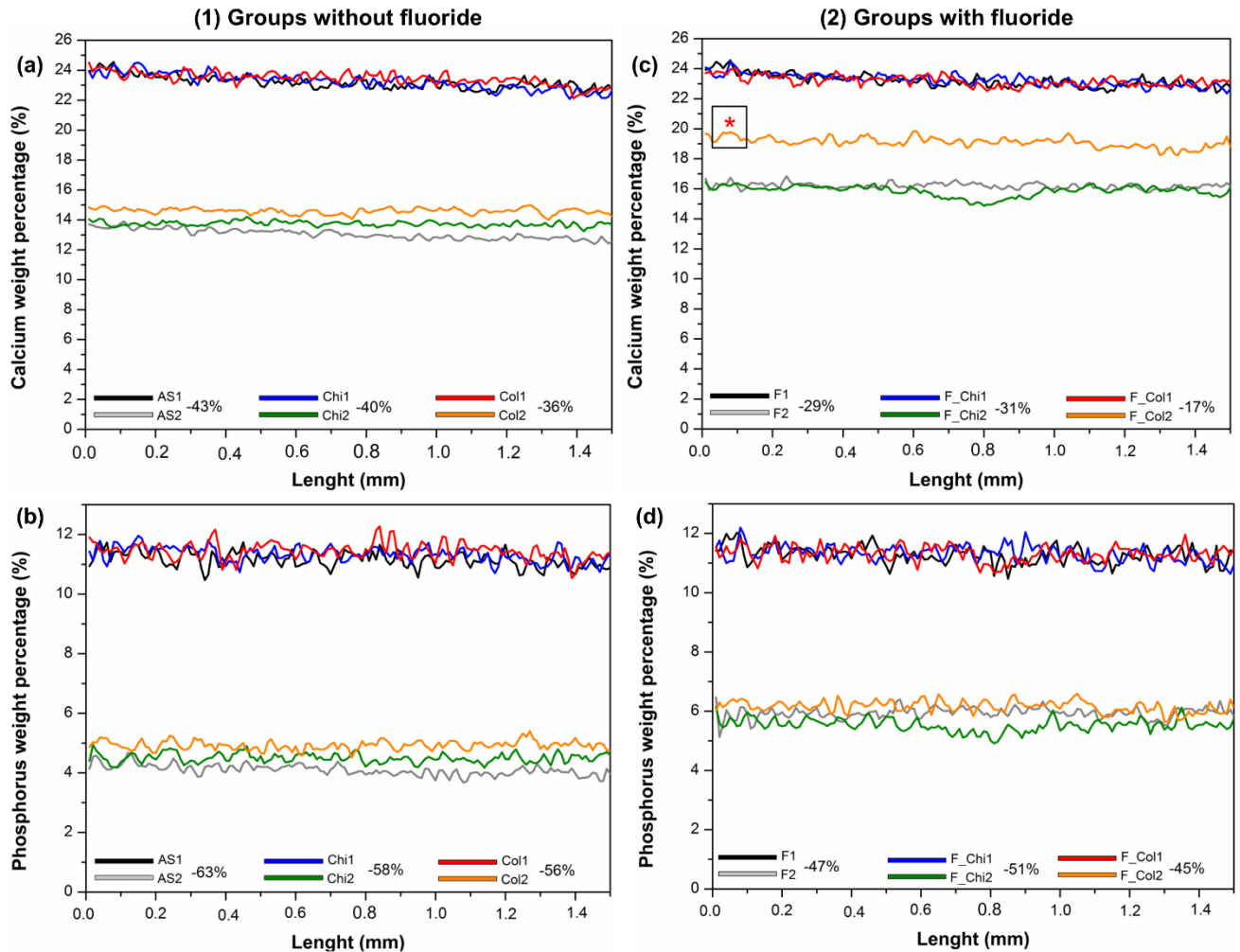
Tabela 4: Bandas mostradas nos espectros (cm^{-1}) obtidos para amostras de colágeno hidrolisado e quitosana (Kumari *et al.*, 2015; Prestes *et al.*, 2013)

Colágeno	Quitosana	Interpretação
3278	3337	Estiramento O-H
-	2863	Vibração atribuída ao estiramento CH
1634	1651	Vibração C=O da amida I
1523	-	Vibração da amida II (vibração plana em C-N e N-H ou CH ₂ de glicina)
1445	-	Vibrações dos anéis de pirrolizidina de prolina e hidroxiprolina
1393	-	Deformação de amina C-N
1236	-	Vibrações Amida III (estiramento C-N e vibração N-H)
-	1031	Alongamento C-O-C
1080	-	Tensão axial C-N
-	880	Ligações glicosídicas β -1.4

Fonte: Nahorny *et al.*, (2021).

Os resultados das medidas de mapeamento em linha por μ -EDXRF para os grupos experimentais estão resumidos nos Gráficos 1 e 2. Os mapeamentos de linha no comprimento da superfície dentinária mostraram os perfis de conteúdo inorgânico após a realização dos ciclos erosivos (Gráfico 1). O conteúdo de cálcio ao longo da distância percorrida na superfície da dentina mostrou menores concentrações de cálcio na dentina dos grupos sem flúor (Gráfico 1a) após os ciclos erosivos do que nos grupos fluoretados (Gráfico 1c). O conteúdo de cálcio e fósforo da dentina nos grupos sem flúor apresentou menor efeito dos ciclos de erosão na ordem Col < Chi < AS, e nos grupos contendo flúor a ordem foi F_Col < F < F_Chi. O grupo com a menor redução de cálcio foi F_Col (-17%) (Gráfico 1c, *). Em relação ao teor de fósforo (Gráfico 1b, d), o mesmo padrão de alterações foi observado para os grupos sem (1) ou com (2) flúor. No entanto, não houve separação evidente entre os grupos. Os grupos fluoretados (Gráfico 1d) apresentaram menor redução de fósforo do que os grupos não fluoretados (Gráfico 1b).

Gráfico 1: Curvas médias (n = 14) obtidas pelo mapeamento em linha por μ -EDXRF em distância (mm) percorrida na superfície para o teor de cálcio (a, c) e fósforo (b, d) (%) considerando os grupos de tratamentos: (1) sem flúor e (2) com flúor. A alteração no conteúdo inorgânico foi calculada (%). AS, saliva artificial; Chi, quitosana; Col, colágeno hidrolisado; F, flúor; F_Chi, flúor/quitosana; F_Col, flúor/colágeno hidrolisado. Asterisco (*) indica o grupo com a menor redução de cálcio após erosão (F_Col: -17%).



Fonte: Nahorny *et al.*, (2021).

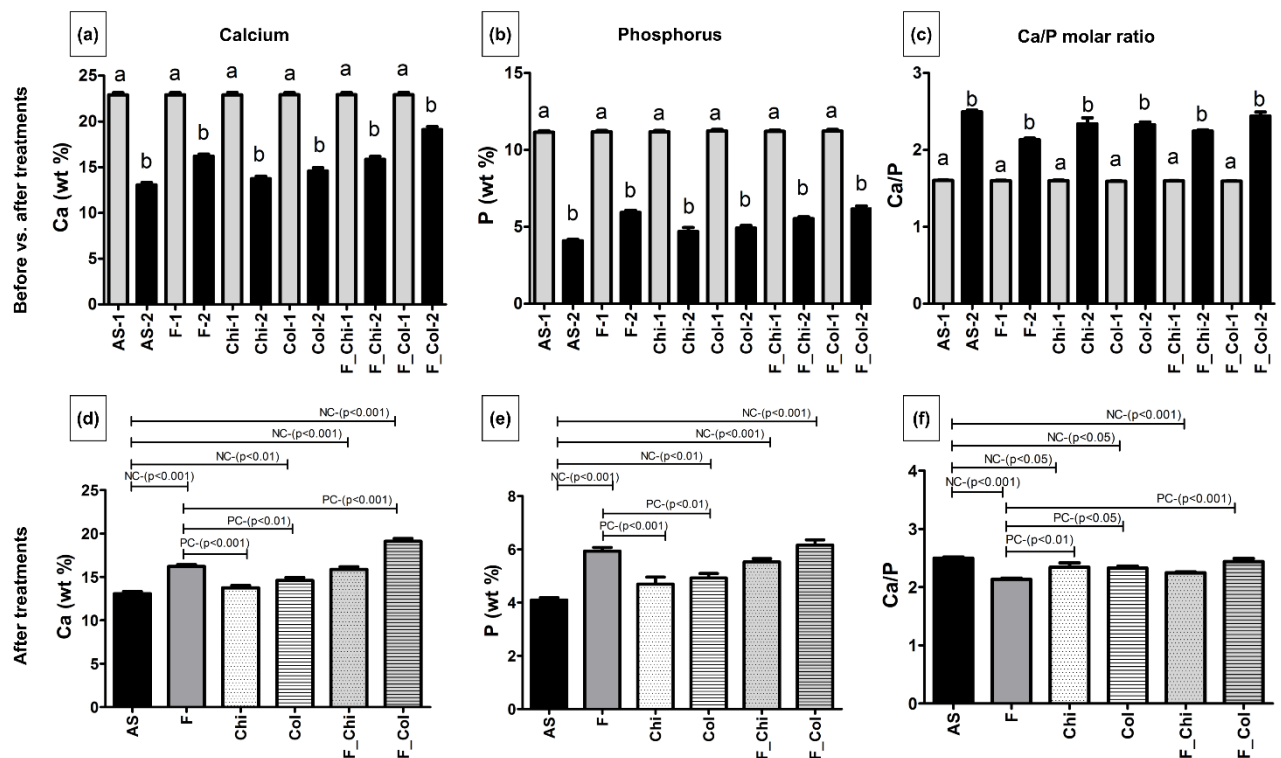
As comparações estatísticas dos dados antes e após a erosão mostraram diferenças significativas após os ciclos erosivos com uma redução de cálcio (Gráfico 2a) e fósforo (Gráfico 2b) e um aumento na razão molar cálcio/fósforo (Gráfico 2c) para todos os grupos experimentais ($p < 0,001$).

Após o tratamento, as amostras apresentaram um teor de cálcio e fósforo significativamente maior com diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), exceto para o tratamento Chi ($p > 0,05$) (Gráfico 2d, e). As relações molares cálcio/fósforo foram menores nos grupos experimentais do que no grupo controle negativo ($p < 0,05$), exceto para o grupo F_Col ($p > 0,05$) (Gráfico 2f).

Nas comparações estatísticas entre o grupo controle positivo e os grupos experimentais, os teores de cálcio e fósforo foram menores para os grupos Chi ($p < 0,001$) e Col ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo F (Gráfico 2d, e). O grupo F_Col apresentou um teor de cálcio mais elevado do que o grupo F ($p < 0,001$, Gráfico 2d).

Após o ciclo erosivo, um aumento significativo na razão molar cálcio/fósforo da dentina para os grupos Chi ($p < 0,01$), Col ($p < 0,05$) e F_Col ($p < 0,001$) foi observado em comparação com o grupo de controle positivo (Gráfico 2f).

Gráfico 2: Média e desvio padrão ($n = 14$) da porcentagem em peso de cálcio (Ca) e fósforo (P) (% em peso) e da razão molar cálcio/fósforo da dentina obtida via mapeamento em linha por μ -EDXRF de acordo com o grupo experimental. As comparações estatísticas foram realizadas entre antes (a-c) e após a erosão (d-f). Teste de comparação múltipla de Bonferroni: antes vs. depois do tratamento. As letras diferentes representam diferenças estatísticas entre a primeira (1-antes da erosão: barra cinza) e a segunda medição (2-após a erosão: barra preta) ($p < 0,001$) (a-c). Teste de comparação múltipla de Dunnett: entre o grupo de controle negativo (NC) e os tratamentos e entre o grupo de controle positivo (PC) e os tratamentos (d-f).



Fonte: Nahorny *et al.*, (2021).

A Fotografia 12 apresenta os resultados do mapeamento em área por μ -EDXRF da dentina tratada com materiais e submetida aos ciclos erosivos. A escala de cores nos mapas de distribuição representa as concentrações elementares: azul escuro representa as concentrações mínimas e branco representa as concentrações máximas dos respectivos componentes. As imagens químicas obtidas destacam as diferenças no conteúdo inorgânico entre os grupos de tratamento. As imagens com o perfil químico da distribuição do cálcio e do fósforo mostraram efeitos menos erosivos na dentina na ordem $F < F_Col < F_Chi < AS < Chi < Col$ para ambos os elementos (Fotografia 12).

As imagens químicas dos grupos sem flúor mostraram um padrão indicativo de menor cobertura do que nos grupos tratados com flúor (Fotografia 12). O perfil de cálcio da dentina tratada com colágeno hidrolisado revelou um padrão de cobertura diferente dos demais tratamentos. As imagens mostraram que manchas de baixa concentração de material (manchas azuis e ciano, Fotografia 12) interceptam a distribuição de cálcio por toda a superfície da dentina. As áreas avermelhadas e amareladas apresentadas nos mapas químicos dos grupos tratados com flúor indicam a deposição de partículas inorgânicas ou cobertura superficial por material ou composição (manchas vermelhas e amarelas, Fotografia 12). O tratamento com flúor resultou nas maiores concentrações de cálcio e fósforo dos elementos distribuídos na área mapeada, seguidos por F_Col e F_Chi , em contraste com os grupos não fluoretados.

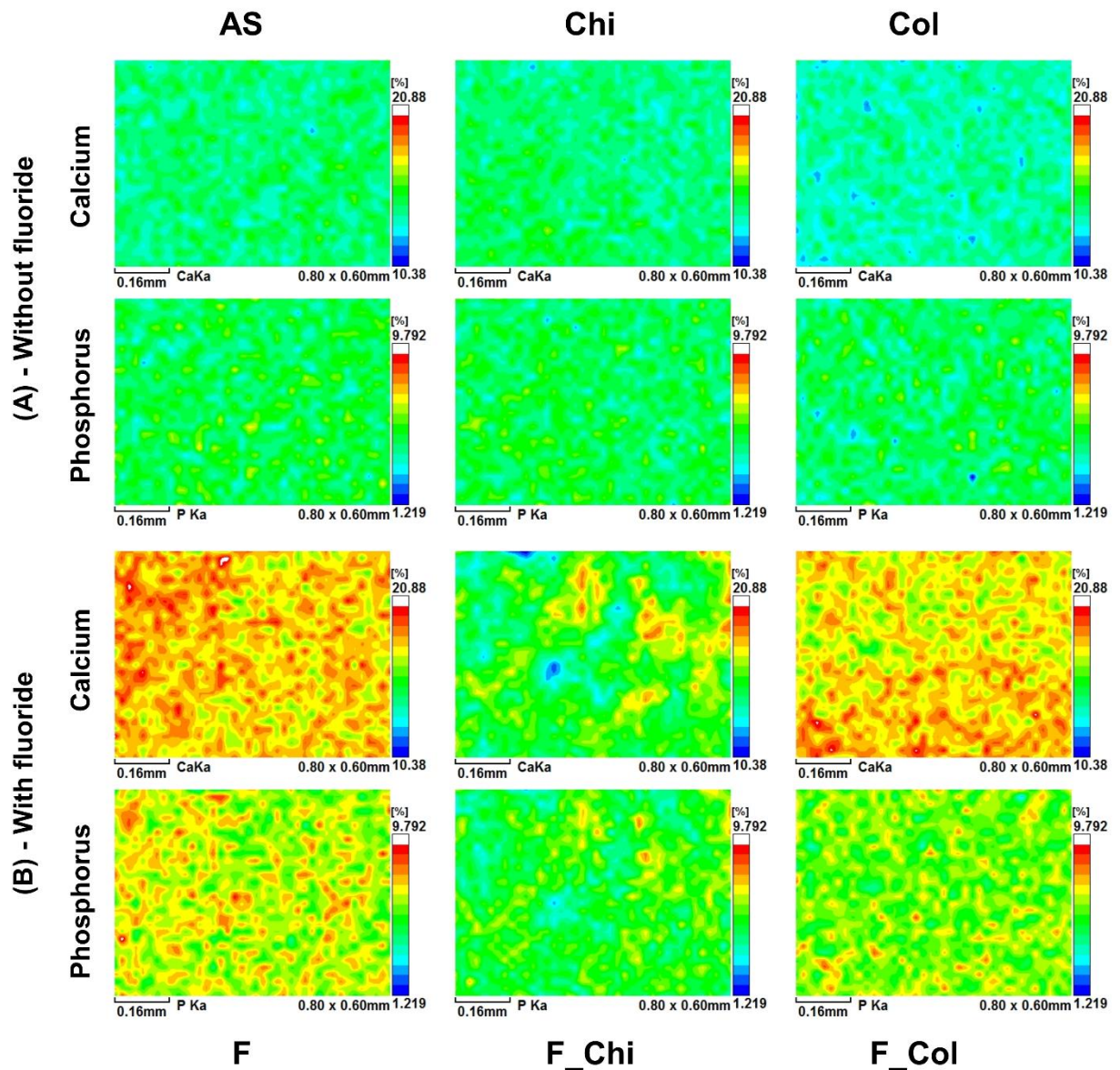
A Fotografia 13 apresenta as micrografias obtidas por MEV da raiz da dentina bovina após o tratamento com materiais e ciclos erosivos. As micrografias dos grupos sem tratamento com flúor mostraram diferentes padrões de cobertura entre eles (Fotografia 13A). A dentina da amostra submetida à desmineralização e remineralização com saliva artificial (controle negativo) apresentou superfície sem cobertura estando os túbulos dentinários visivelmente abertos. Os tratamentos Chi e Col produziram uma espécie de cobertura superficial com padrão diferenciado. O tratamento com quitosana na dentina resultou em uma fina camada de cobertura obliterando os túbulos dentinários e também a presença de aglomerados de quitosana (Fotografia 13A setas amarelas, 5000x). No entanto, a superfície da dentina tratada com colágeno mostrou um padrão semelhante a um favo de mel. Sob maior aumento, foi observada oclusão total (círculo amarelo) e parcial (seta amarela) dos túbulos dentinários na superfície sem aglomerados de partículas (Fotografia 13A).

Em contraste, as micrografias dos grupos tratados com flúor (Fotografia 13B) mostraram deposição de partículas proeminentes com oclusão dos túbulos dentinários após o ciclo erosivo,

exceto no grupo F_Chi, onde a dentina apresentou uma camada de cobertura sem aglomerados (Fotografia 13B, círculo amarelo e setas).

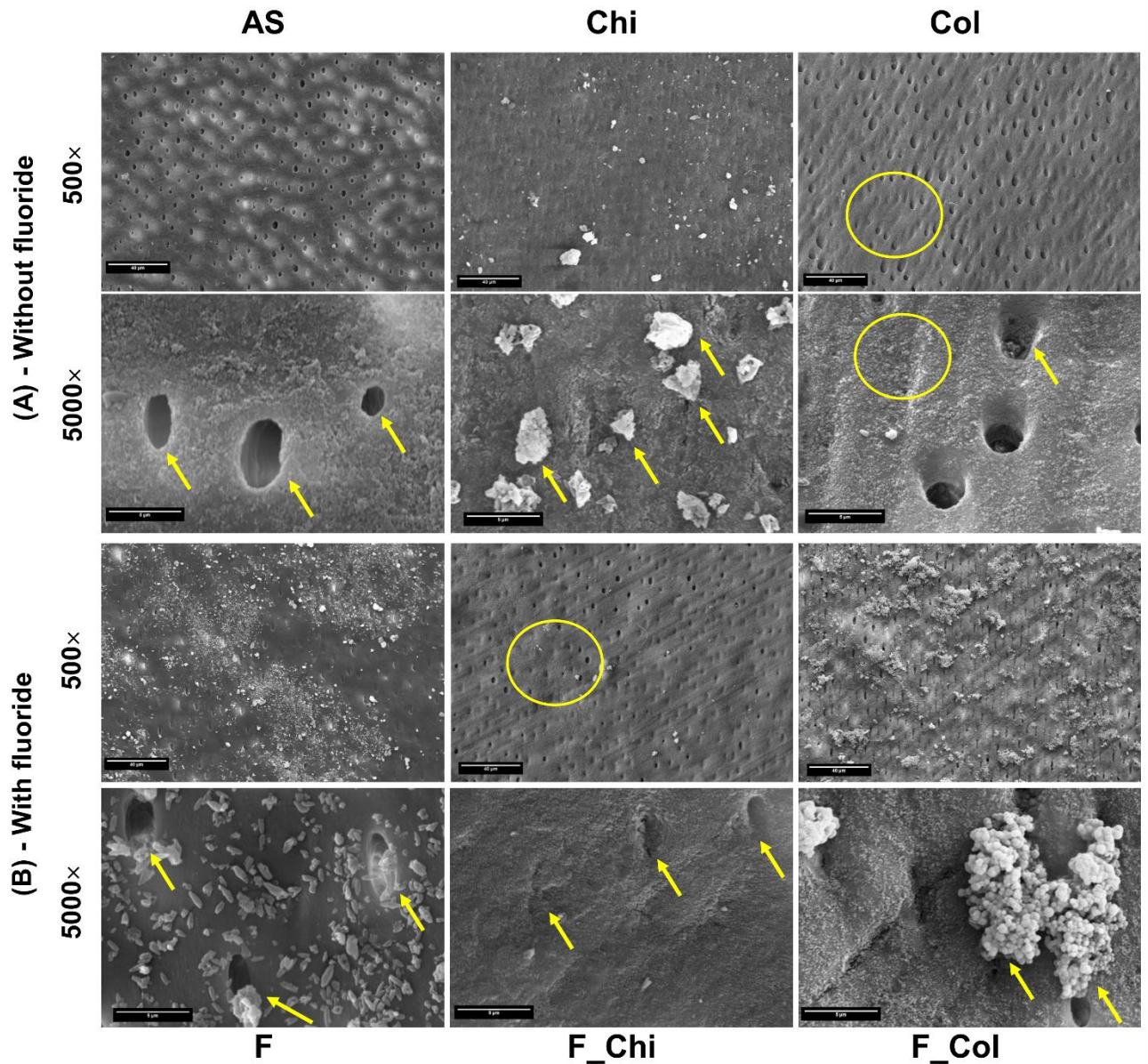
As micrografias da dentina tratada com flúor (F) mostraram um padrão de deposição de partículas não homogêneo com oclusão tubular parcial (Fotografia 13B, setas amarelas). Em contraste, o tratamento com F_Col mostrou deposição de partículas de forma aglomerada com oclusão tubular parcial ou total (Fotografia 13B, setas amarelas). Após a erosão, o grau de cobertura da superfície foi observado na seguinte ordem: F_Col > F > Chi > F_Chi > Col > AS.

Fotografia 12: Imagens representativas da distribuição de cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície da dentina obtidas por microanálise em área por μ -EDXRF após o ciclo erosivo dos grupos sem tratamento com flúor (A) e com flúor na composição do tratamento (B): saliva artificial - controle negativo (AS), quitosana (Chi), colágeno (Col), flúor - controle positivo (F), flúor/quitosana (F_Chi) e flúor colágeno (F_Col). O gradiente na intensidade da escala de cores indica as variações no conteúdo de cálcio e fósforo. Os locais com alto teor de minerais são mostrados em vermelho e laranja, enquanto aqueles com baixo teor de minerais são mostrados em verde / azul.



Fonte: Nahorny *et al.*, (2021).

Fotografia 13: Micrografias obtidas por MEV ilustrando as diferenças no padrão morfológico de cobertura de dentina produzida pelos tratamentos dos grupos sem tratamento com flúor (A) e com flúor na composição do tratamento (B) nos aumentos de 500 e 5000×. A amostra tratada com saliva artificial (controle negativo, AS) apresenta: superfície erodida com túbulos dentinários expostos (setas) na dentina. A amostra tratada com suspensão de quitosana (Chi) apresenta uma camada de cobertura de partículas de quitosana. Oclusão tubular total (círculos) e oclusão parcial (seta) na superfície dentinária do grupo colágeno (Col). A amostra tratada com flúor (controle positivo, F) apresenta uma camada de cobertura de depósitos (setas). Suspensão de flúor/quitosana (F_Chi) produziu uma camada de cobertura com túbulos dentinários obstruídos e parcialmente obstruídos (círculo e setas). Camada de cobertura de aglomerados (setas) na superfície dentinária do grupo flúor/colágeno (F_Col). Os aglomerados são destacados em maior ampliação (setas). Barras de ampliação: 40 µm (500×) e 5 µm (5000×).



Fonte: Nahorny *et al.*, (2021).

6 DISCUSSÃO

A remineralização da dentina é um procedimento com relevância clínica no tratamento da cárie, hipersensibilidade dentinária e erosão dentária (DI FOGGIA et al., 2019). Entender como os componentes presentes na dentina interagem com os biomateriais é importante para selecionar e produzir compostos contendo materiais que tenham uma interação mais direta por afinidade iônica e química com os componentes da dentina.

O uso da quitosana para tratamentos de proteção da dentina em processos de erosão dental tem sido relatado na literatura com resultados promissores, associada ou não com flúor, seja na forma de dentifrícios, bochechos ou composições (XU et al., 2011; GANSS et al., 2012; KEEGAN et al., 2012; GANSS; KLIMEK; SCHLUETER, 2014; BELTRAME, 2016; PINI et al., 2016; URURAHY et al., 2017; BELTRAME et al., 2018; SOUZA et al., 2020; DE SOUZA et al., 2021). Entretanto, o uso do colágeno na forma de suspensão aplicada diretamente na dentina com foco na prevenção ou tratamento da erosão dental, associado ao flúor não foi explorado.

O presente estudo traz uma abordagem inovadora de aplicação do colágeno de origem bovina na dentina. Os materiais de origem animal (quitosana – obtida de crustáceos; colágeno – de origem bovino) foram testados associados ou não ao flúor, aplicados em dentina, como uma forma de prevenção/tratamento da erosão dental causada por suco de laranja. A realização do estudo em duas etapas possibilitou primeiramente a caracterização da interação com a dentina de diferentes tipos de colágeno, quitosana e quitosana associada ao flúor com a finalidade de selecionar os materiais com maior afinidade pelo substrato e utilizar em uma segunda etapa aplicado em dentina para testar em ciclos de erosão simulada.

No estudo inicial (Etapa 1), as técnicas de μ -EDXRF e MEV demonstraram a formação de uma camada de cobertura superficial (parcial ou total) na dentina produzida pelos materiais. Os materiais quitosana + flúor (Chi_F) e colágeno hidrolisado (H_Col) resultaram em uma camada uniforme para a proteção da dentina (Tabela 3, Fotografias 9 e 10). Entretanto, os grupos de colágeno hidrolisado em fibras (HF_Col) e colágeno não hidrolisado (NH_Col) não apresentaram interação suficiente com a dentina para formar uma camada protetora contínua e uniforme (Fotografias 9 e 10).

A diferença na interação entre os grupos Chi (depósito esparsos de grãos) e Chi_F (camada espessa e uniforme) com a dentina (Fotografias 9 e 10) provavelmente se deu pela presença do flúor o qual permitiu a incorporação de íons F^- à quitosana e gerado um composto híbrido com maior afinidade pela hidroxiapatita presente na dentina. No entanto, o material quitosana sem

o flúor, é irregular e heterogêneo e devido à agregação de partículas e à falta de interação intermolecular entre a matriz orgânica e inorgânica da dentina (HU et al., 2020) resultou em pouca interação com o substrato (Fotografias 9 e 10).

Os resultados obtidos pelo grupo H_Col também são extremamente relevantes, tanto para o aspecto de obtenção de camada superficial homogênea (Fotografias 9 e 10) quanto para o aspecto da composição química do material e possível interação e afinidade com o próprio colágeno dentinário. Esta interação foi favorecida pela aplicação prévia do condicionamento químico pelo ácido fosfórico que criou uma superfície desmineralizada simulando assim um quadro clínico com perda de componentes inorgânicos. Este condicionamento expôs o colágeno da dentina proporcionando um substrato mais favorável à adesão dos materiais testados.

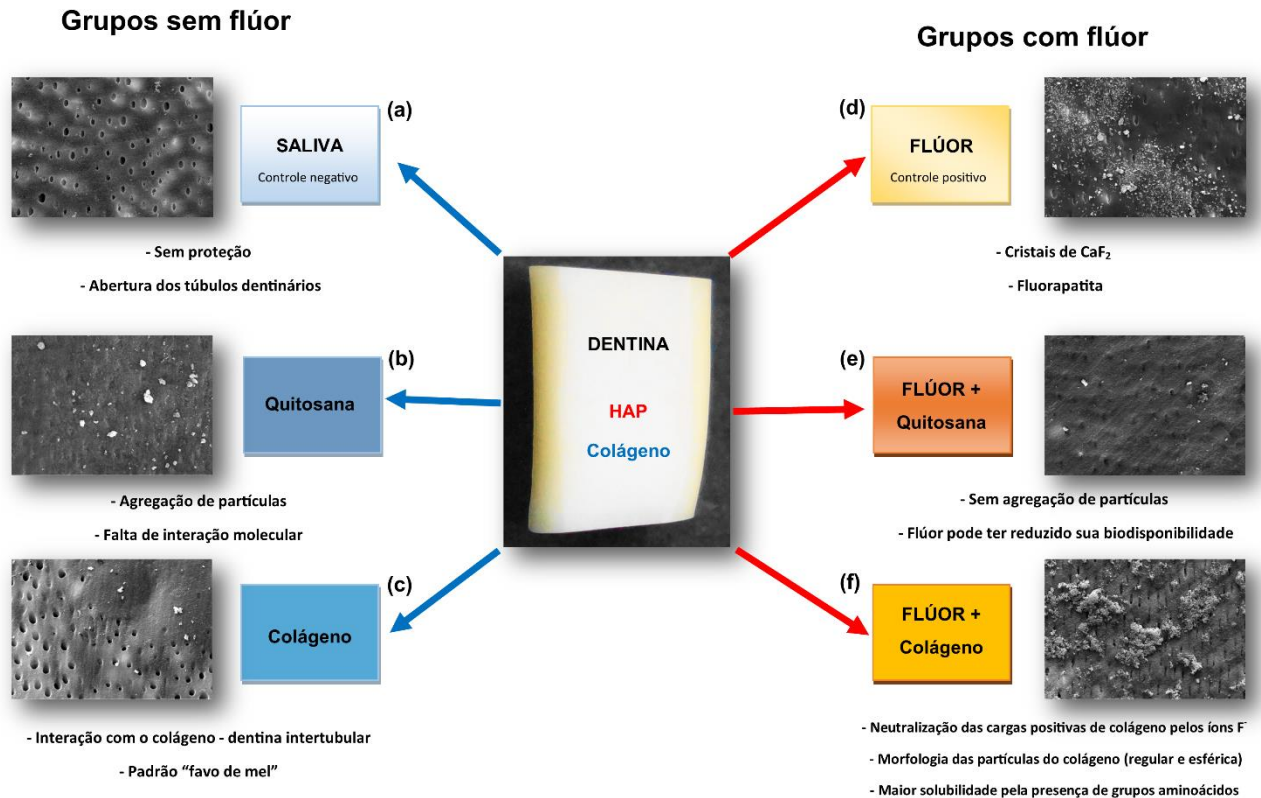
A possibilidade de realizar mapeamentos de área na superfície da dentina permitiu compreender melhor como os materiais se comportam em uma determinada superfície com a vantagem de uma maior precisão de detalhes. As técnicas combinadas permitiram a verificação da capacidade do material em produzir uma distribuição de partículas heterogênea na superfície como no caso dos materiais HF_Col e NH_Col (Fotografia 9) indicando assim pouca afinidade pelo substrato.

A análise morfológica-composicional combinada realizada no estudo inicial evidenciou como promissora a utilização da associação entre o pó de quitosana e o flúor fosfato acidulado em gel para a produção de um novo material com significativa relevância clínica para a proteção da estrutura dentária. As ferramentas analíticas aplicadas permitiram investigar a composição química associada à morfologia das partículas e sua distribuição ao longo da superfície, indicando como as melhores opções de materiais o colágeno hidrolisado e a quitosana associada ao flúor. A partir dos dados obtidos na etapa inicial, foi possível um direcionamento na escolha de materiais com maior interação com a dentina para dar sequência ao segundo estudo (Etapa 2).

Foram observados resultados diferentes no presente estudo, quanto ao tipo de tratamento de cobertura aplicado. O Esquema 3 apresenta de forma resumida as informações mais relevantes relacionadas aos resultados obtidos e os mecanismos que acreditamos estarem relacionados. Os processos são diferentes para materiais sem flúor e com flúor. Para os grupos sem flúor, as alterações composicionais provavelmente correspondem à inclusão de uma camada inorgânica na superfície (como precipitados ou modificação de superfície - Chi) ou de uma camada orgânica (incorporação de material na dentina intertubular - Col). Para os grupos com flúor, provavelmente as alterações composicionais correspondem à deposição de cristais

(F), formação de camada (F_Chi) ou presença de precipitados aglomerados (F_Col) (Esquema 3).

Esquema 3: Ilustração esquemática representativa dos efeitos dos biomateriais e tratamentos de superfície (grupos sem flúor e com flúor) aplicados na dentina e submetidos à erosão química: a) saliva artificial (AS); b) quitosana (Chi); c) colágeno hidrolisado (Col); d) flúor fosfato acidulado em gel (F); e) flúor e quitosana (F_Chi); f) flúor e colágeno hidrolisado (F_Col).



Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados do segundo estudo (Etapa 2), foi possível observar a capacidade de cobertura de superfície com o uso de quitosana, colágeno hidrolisado ou materiais híbridos contendo flúor e sua resistência após ciclos erosivos considerando apenas uma aplicação dos biomateriais como tratamento de superfície diferente de estudo anterior o qual aplicou o material de tratamento a cada ciclo de erosão (BELTRAME et al., 2018).

No presente estudo, os mapeamentos químicos de μ -EDXRF evidenciaram a interferência que os biomateriais produziram no perfil da distribuição elementar de cálcio e fósforo após a ciclagem de pH (Gráficos 1 e 2, Fotografia 12). Os resultados observados nos mapeamentos são decorrentes do tipo de camada produzida pelos materiais testados. As concentrações relativas de elementos inorgânicos na dentina indicam o grau de eficácia da camada de cobertura que restou após a erosão. As diferenças observadas nos perfis em linha da composição

inorgânica da dentina após a ciclagem de pH foram associadas à composição do material de base, tipo de camada formada e à presença ou não de flúor (Gráfico 1). O tratamento mais eficaz para a dentina resultou em uma camada mais espessa e homogênea de depósitos cobrindo a superfície. Quando os raios X incidentes do μ -EDXRF interagem com a superfície da dentina recoberta pelos materiais remanescentes, um número menor de raios X passa por essa camada mais espessa, resultando em quantidades menores de raios X retroespalhados. Conseqüentemente, foram observadas percentagens em peso de cálcio e fósforo reduzidas.

Considerando os grupos sem flúor (materiais puros dissolvidos), o grupo de colágeno hidrolisado (Col) apresentou uma redução menor na concentração de cálcio (-36%) e de fósforo (-56%) após a ciclagem de pH em comparação com os outros grupos sem flúor (Chi: -40% Ca, -58% P e AS: -43% Ca, -63% P) o que indica uma interação maior com o substrato dentinário provavelmente na dentina intertubular (Fotografia 13, Esquema 3c).

Os níveis significativos de perda de material inorgânico observados no grupo AS (controle negativo) foram evidentes nas imagens químicas obtidas por μ -EDXRF (Fotografia 12A, pontos azuis) e nas micrografias obtidas por MEV (Fotografia 13A, túbulos dentinários visivelmente abertos). Essa característica foi decorrente do pré-tratamento com ácido fosfórico somado à ação erosiva do suco de laranja durante a desmineralização e ausência de material de proteção (Esquema 3a) (NAHORNY et al., 2017; SOARES et al., 2020).

A redução observada na desmineralização dentinária no grupo quitosana está de acordo com estudo prévio onde os autores relataram o efeito preventivo da suspensão de quitosana na forma de redução da perda de cálcio. Beltrame et al. (2018) trataram a dentina com uma solução de quitosana fosforilada a 0,5% em um modelo de erosão *in vitro* e verificaram uma redução na perda de dentina de aproximadamente 32% em pH neutro e alcalino, em comparação com grupos tratados apenas com ácido cítrico/saliva. No entanto, diferentemente do protocolo do presente estudo, no estudo de Beltrame et al. (2018), a solução de quitosana foi aplicada após cada ciclo de desmineralização/remineralização, o que provavelmente criou um efeito de uma camada incorporada de tratamento.

Os resultados obtidos pela análise de FTIR do presente estudo (Fotografia 11d) confirmaram, pelas características espectrais de cada biomaterial, que a suspensão contendo colágeno hidrolisado (Col) apresenta uma afinidade melhor pela superfície dentinária do que a quitosana (Chi) o que foi evidenciado nos mapeamentos em linha (Gráfico 1a, b). A presença de mais bandas orgânicas encontradas pela análise de FTIR no pó de colágeno do que na quitosana provavelmente resultou em uma interação elevada com o conteúdo de colágeno da

dentina previamente desmineralizada (Gráfico 1a, b). O pó de colágeno hidrolisado mostrou bandas de amida do tipo I, II e III, enquanto a quitosana mostrou apenas uma banda de amida do tipo I (PRESTES et al., 2013; KUMARI et al., 2015) (Tabela 4).

O colágeno é uma proteína de estrutura molecular simples e insolúvel em água devido à presença de diversos aminoácidos hidrofóbicos (SILVA; PENNA, 2012). O colágeno hidrolisado passa por um processo de hidrólise onde é quebrado em partículas menores para ser melhor absorvido, enquanto no colágeno não hidrolisado esse processo não ocorre. Devido a esse processo, o colágeno pode se tornar mais solúvel. É importante notar que o pó de colágeno tendeu a formar mais aglomerados (Fotografia 11a) do que o pó de quitosana (Fotografia 11b) e essa característica do colágeno também pode ter potencializado sua afinidade pela dentina.

A ausência de diferenças estatísticas significativas no conteúdo inorgânico da dentina entre o controle negativo e o grupo Chi (Gráfico 2a, b, d, e) pode ser explicada por dois mecanismos diferentes em cada grupo. O tratamento com ácido fosfórico da dentina sadia resulta em uma superfície desmineralizada homogênea com matriz orgânica exposta, sem a presença de *smear layer* e com túbulos dentinários abertos (controle negativo, Fotografia 13A; Esquema 3a). Esta remoção de mineral pelo pré-tratamento com ácido resultou em perda mineral e redução das concentrações de cálcio e fósforo na superfície dentinária, conforme mostrado pelos mapas em linha obtidos por μ -EDXRF (Gráfico 2a, b, d, e). Entretanto, no grupo Chi, a suspensão à base de quitosana interagiu com a superfície da dentina com alguns depósitos formadores de adesão de material (cobertura esparsa) após a erosão (Fotografia 13A). As partículas depositadas e a camada de cobertura interferiram na forma como o raio X interagiu com a superfície dentinária, reduzindo a detecção de raios X dispersos e, portanto, os percentuais de cálcio e fósforo, conforme mecanismo relatado anteriormente (SOARES et al., 2019).

Ururahy *et al.* (2017), observaram em seu estudo o mesmo padrão de exposição dos túbulos dentinários em micrografias MEV após o condicionamento ácido. Porém, no caso do tratamento com quitosana, os autores observaram que a quitosana se depositou predominantemente dentro dos túbulos dentinários, ao contrário dos resultados do presente estudo, onde havia uma camada de cobertura remanescente de aglomerados de quitosana após os ciclos erosivos (Fotografia 13A, setas; Esquema 3b).

O padrão observado da distribuição do cálcio com áreas localizadas de reduzida concentração de material intercaladas com áreas/pontos de maior concentração de cálcio e fósforo na superfície da dentina no grupo Col pode ser um indicador de que o colágeno

hidrolisado aderiu à matriz orgânica exposta da dentina intertubular (manchas azuis e ciano, Fotografia 12A). Este resultado do μ -EDXRF foi confirmado na micrografia de maior aumento obtida por MEV (Fotografia 13A).

As micrografias MEV mostraram um perfil de interação diferente do colágeno hidrolisado com a dentina (Fotografia 13A, círculo) comparado à quitosana. Na micrografia de maior aumento, pode-se notar que a dentina intertubular foi modificada e totalmente recoberta por uma fina camada com um padrão diferente do observado nos grupos controle negativo (ausência de camada) e Chi (Fotografia 13A, depósitos de quitosana). Curiosamente, o colágeno hidrolisado modificou o padrão da dentina intertubular, produzindo um padrão semelhante a um favo de mel suave (Fotografia 13A, menor aumento, círculo; Esquema 3c).

Considerando o grupo do flúor e dos materiais híbridos, o tipo de partícula novamente influenciou o resultado da camada de cobertura produzida, conforme mostrado pelos perfis dos mapeamentos em linha (Gráfico 1b). Notavelmente, no grupo F_Col, a concentração de cálcio foi reduzida em apenas 17% após os ciclos (Gráfico 1c, asterisco), e este resultado foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo de controle positivo ($p < 0,001$, Gráfico 2a). A análise estatística mostrou similaridade em termos de conteúdo inorgânico entre os materiais híbridos e o grupo controle positivo (Gráfico 2d-f). No entanto, as imagens de mapeamento químico revelaram que o grupo F_Col produziu um padrão de cobertura semelhante ao do grupo controle positivo (Gráfico 2f, Fotografia 12B). As micrografias MEV confirmam este resultado, pois os depósitos de material podem ser observados em ambos os grupos F e F_Col (Esquema 3d, f). Em contraste com os grupos F e F_Col, o grupo F_Chi apresentou uma camada de cobertura esparsa (Fotografia 13B, Esquema 3e).

A combinação de flúor com quitosana pareceu modificar seu efeito protetor. SOUZA et al. (2020) avaliaram a combinação de tetrafluoreto de titânio/fluoreto de sódio (TiF_4/NaF) com quitosana, o que pareceu reduzir seu efeito protetor. Os autores especularam que o TiF_4/NaF interagiu com a quitosana reduzindo sua biodisponibilidade e mencionaram que essa hipótese precisa ser confirmada.

No presente estudo, foram observados no grupo F (controle positivo), aglomerados de cristais espalhados pela dentina, ocluindo parcialmente os túbulos, o que pode ser atribuído à deposição de CaF_2 (Fotografia 13B). Essa camada de cristais permaneceu após os ciclos erosivos na superfície dentinária, promovendo assim uma barreira adicional com algum nível de proteção, corroborando com estudos anteriores (CASTILHO et al., 2015; KUNAM et al., 2016; SOARES et al., 2020). O mecanismo relatado para explicar a deposição de partículas é

de que o fluoreto de sódio interage com os íons cálcio da hidroxiapatita presentes na dentina, resultando na deposição de cristais de fluoreto de cálcio. Porém, devido ao seu tamanho reduzido, não são eficazes em promover a oclusão tubular total (CASTILHO et al., 2015; KUNAM et al., 2016).

Já o tratamento com a suspensão do grupo F_Col produziu um padrão de cobertura diferente dos outros grupos de flúor. A suspensão de colágeno dispersa no gel de flúor apresentou maior tendência a formar aglomerados maiores na superfície da dentina do que no grupo controle positivo (Fotografia 13B). Isso pode ser atribuído à neutralização das cargas positivas das partículas de colágeno pelos íons F^- . Esta formação de aglomerados maiores e por toda a superfície da dentina no grupo F_Col pode ser devido à característica própria da partícula de colágeno hidrolisado a qual possui uma morfologia mais regular e esférica em comparação com a partícula de quitosana (Fotografia 11). Além disso, a superfície de colágeno exposta na dentina desmineralizada não é um substrato favorável para a nucleação mineral devido à polaridade e carga superficial fracas nesta condição (HASHMI, 2019). Assim, a associação do flúor com o colágeno pode ter alterado a polaridade e cargas superficiais do colágeno remanescente na dentina peri e intertubular e favorecido a deposição e nucleação de partículas que foram observadas na micrografia MEV (Fotografia 13B).

Comparando-se a quitosana com o colágeno, verifica-se que a interação da sua composição e cargas elétricas com um substrato com níveis de pH ácido influencia na formação de depósitos e camada de superfície. A presença de muitos grupos amino na superfície da quitosana auxilia na geração de potenciais zeta positivos porque eles tendem a permanecer protonados em níveis de pH ácido, resultando na estabilização das partículas (NURUNNABI et al., 2017). A carga sobre o colágeno, por sua vez, origina-se da presença de resíduos de aminoácidos ácidos e básicos. O ponto isoelétrico (PIE) do colágeno é de aproximadamente pH 7,4. Em valores de pH abaixo do PIE, a carga geral será positiva conforme progressivamente mais carboxilato é protonado (BALLANTYNE; DAVIS, 2019).

O colágeno hidrolisado utilizado nas suspensões preparadas apresenta maior solubilidade do que o colágeno nativo (LEÓN-LÓPEZ et al., 2019). No entanto, a desvantagem do colágeno hidrolisado é que o material não pode formar estruturas de sustentação por si só devido ao baixo peso molecular dos peptídeos (LEÓN-LÓPEZ et al., 2019). Acreditamos que, devido à sua composição de aminoácidos, solubilidade e interação química com os íons F^- , o tratamento com F_Col resultou na deposição de aglomerados de material à base de flúor enriquecido com colágeno (Fotografia 13B).

Os efeitos positivos do colágeno adicionado ao flúor em gel são clinicamente relevantes em termos de proteção da integridade do colágeno dentinário. O colágeno exposto da matriz dentinária após a desmineralização (erosão ou cárie) é suscetível à degradação. Proteases de bactérias e saliva ou MMPs do hospedeiro são conhecidas por degradarem o colágeno dentinário ao longo do tempo (KISHEN et al., 2016). Assim, fica evidente que o colágeno presente na dentina desempenha um papel relevante na prevenção e/ou tratamento da erosão ácida. A presença de colágeno no material de tratamento também é um fator chave para uma interação mais efetiva com o substrato dentinário, conforme demonstrado no presente estudo.

Os materiais preparados com colágeno e quitosana no presente estudo são promissores para aplicações futuras na odontologia. Comparando com os materiais artificiais tradicionalmente utilizados para reparar tecidos duros humanos na clínica, como cerâmicas, ligas, etc., os materiais à base de quitosana têm custos reduzidos e melhor biocompatibilidade, com baixa possibilidade de causar reações alérgicas e inflamatórias no corpo humano (AGUILAR et al., 2019). O colágeno também é um material com vantagens interessantes que facilitam sua aplicação. As fontes de obtenção de colágeno bruto se expandiram rapidamente onde podem ser obtidos de tecidos conjuntivos de touros, ovelhas, porcos, cavalos e humanos. Uma variedade de métodos de solubilização de colágeno também foi desenvolvida (SHEKHTER et al., 2019). O colágeno bovino possui excelente biocompatibilidade e bioatividade (PRESCOTT et al., 2008) e baixa imunogenicidade em humanos (SUMITA et al., 2006).

Com relação ao uso de dentes bovinos nos experimentos do presente estudo, a utilização deste substrato é justificada com base na literatura. Os dentes bovinos têm sido utilizados regularmente em estudos envolvendo erosão e abrasão dentária (SOARES; DO ESPÍRITO SANTO, 2015; URURAHY et al., 2017; GOMES et al., 2018; AINOOSAH et al., 2020; SARIALIOGLU GUNGOR; DONMEZ, 2021). A dentina bovina coronal é semelhante à dentina humana com em relação ao número e diâmetro dos túbulos (SCHILKE et al., 2000) e dureza (FONSECA et al., 2008). O uso de incisivos bovinos como substitutos para dentes humanos em estudos envolvendo erosão / abrasão é bem aceito porque o desgaste da dentina em terceiros molares humanos e incisivos bovinos é bastante semelhante (WEGEHAUPT et al., 2008; TJÄDERHANE et al., 2009).

Podemos considerar como uma limitação do presente estudo o fato dos métodos analíticos aplicados não serem capazes de mensurar diretamente a perda de íons na dentina. No entanto, esta limitação foi contornada pelo uso da técnica de μ -EDXRF, a qual avalia indiretamente a

perda de íons. Além disso, ambos os métodos analíticos utilizados foram capazes de mostrar claramente a influência dos materiais após a erosão na morfologia e composição da superfície dentinária.

Em resumo, o presente estudo detalha uma nova abordagem de material híbrido à base de flúor para produzir uma camada de proteção de superfície contra a erosão. Os materiais mostraram um grande potencial para proteger o colágeno dentinário. Estudos adicionais são necessários para avaliar as diferentes concentrações de colágeno e quitosana adicionados ao flúor. É necessário avaliar o efeito dessas combinações na recuperação da integridade do colágeno dentinário e na mineralização da rede de hidroxiapatita presente no local. A resistência da cobertura do material não foi avaliada após a escovação simulada e torna-se uma possibilidade de estudo futuro para somar mais informações sobre a resistência dos novos materiais.

7 CONCLUSÃO

No primeiro estudo, as análises de MEV e μ -EDXRF demonstraram uma maior cobertura de superfície e menor alteração no conteúdo mineral no material composto pela associação da quitosana com flúor seguido pelo material colágeno hidrolisado em pó, respectivamente. Os materiais à base de colágeno hidrolisado e quitosana resultaram na melhor cobertura de superfície, em diferentes graus de interação com a dentina radicular.

No segundo estudo, foi verificado que as partículas do pó de colágeno hidrolisado apresentaram uma morfologia mais regular e características esféricas quando comparado com a quitosana. Devido à sua natureza orgânica, a quitosana e o colágeno hidrolisado apresentam apenas um padrão amorfo nas análises de DRX. A presença de mais bandas orgânicas no espectro FTIR do colágeno hidrolisado provavelmente resultou em uma maior interação deste material com o conteúdo de colágeno da dentina previamente desmineralizada.

As análises de MEV e μ -EDXRF evidenciaram alterações significantes na morfologia e na composição inorgânica, respectivamente, para todos os materiais após a erosão simulada. Os melhores resultados em relação à formação de camada protetora mais homogênea e de menor desmineralização na dentina foram obtidos no grupo de colágeno hidrolisado com flúor seguido da quitosana.

Os materiais à base de colágeno e quitosana associados ao flúor são promissores em odontologia para a aplicação de cobertura e proteção da dentina radicular.

8 PUBLICAÇÕES

Os resultados deste estudo foram publicados em duas partes (Etapas 1 e 2) o que gerou duas publicações distintas.

8.1 Artigo 1



Brazilian Journal of Development | 44670
ISSN: 2525-8761

Combined morphological-compositional analysis of the interaction of collagen and chitosan based-materials with demineralized bovine dentin

Análise morfológica-composicional combinada da interação de materiais à base de colágeno e quitosana com dentina bovina desmineralizada

DOI:10.34117/bjdv7n5-066

Recebimento dos originais: 07/04/2021

Aceitação para publicação: 03/05/2021

Sidnei Nahórny

Mestre em Engenharia Biomédica pela Universidade do Vale do Paraíba
Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), São José dos Campos-SP, Brasil

Endereço: Laboratório de Odontologia e Materiais Aplicados, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP 12.244-000, Brasil.

E-mail: unisidnei@yahoo.com.br

Ivone Regina de Oliveira

Doutora em Ciência e Engenharia dos Materiais pela Universidade Federal de São Carlos

Endereço: Laboratório de Processamento e Caracterização de Materiais Avançados, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP 12.244-000, Brasil.

E-mail: ivonero@univap.br

Luís Eduardo Silva Soares

Doutor em Engenharia Biomédica pela Universidade do Vale do Paraíba
Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), São José dos Campos-SP, Brasil

Endereço: Laboratório de Odontologia e Materiais Aplicados, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP 12.244-000, Brasil.

E-mail: lessoares@univap.br

ABSTRACT

Treatments to promote the biomineralization of dentin are the focus of much research with different materials and processes. Biomineralization is a process mediated by an organic matrix in which organic macromolecules act as models for the nucleation and growth of mineral crystals to form hierarchically ordered hybrid materials, such as bones or teeth. This study describes the application of novel materials based on collagen and chitosan aimed to protect the dentin from erosive conditions. The dentin morphology of the bovine teeth treated with these materials was visualized using scanning electron

8.2 Artigo 2


Received: 10 May 2021 | Revised: 5 October 2021 | Accepted: 24 October 2021

DOI: 10.1002/jemt.23978

RESEARCH ARTICLE

MICROSCOPY
RESEARCH TECHNIQUE **WILEY**

Biom mineralization induced by chitosan and collagen-based materials with fluoride for dentin coverage: Chemical and morphological analysis

Sidnei Nahórny^{1,2} | Ivone Regina de Oliveira² | Luís Eduardo Silva Soares¹ 

REFERÊNCIAS

- ABDELSHAFI, M. A. et al. Bond strength of demineralized dentin after synthesized collagen/hydroxyapatite nanocomposite application. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 121, n., p. 104590, 2021.
- ADDY, M. Tooth brushing, tooth wear and dentine hypersensitivity—are they associated? **International dental journal**, v. 55, n. S4, p. 261-267, 2005.
- AGUILAR, A. et al. Application of chitosan in bone and dental engineering. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 3009, 2019.
- AINOOSAH, S. E. et al. Effect of silver diamine fluoride on the prevention of erosive tooth wear in vitro. **Journal of Dentistry: X**, v. 3, n., p. 100015, 2020.
- ARNAUD, T. M. S.; DE BARROS NETO, B.; DINIZ, F. B. Chitosan effect on dental enamel remineralization: an in vitro evaluation. **Journal of dentistry**, v. 38, n. 11, p. 848-852, 2010.
- BALLANTYNE, A. D.; DAVIS, S. Modelling charge across pH and the isoelectric point of bovine collagen during leather manufacture-256. v., n., p., 2019.
- BARTLETT, D.; O'TOOLE, S. Tooth wear and aging. **Australian dental journal**, v. 64, n., p. S59-S62, 2019.
- BELTRAME, A. P. C. et al. Effect of phosphorylated chitosan on dentin erosion: an in vitro study. **Caries Research**, v. 52, n. 5, p. 378-386, 2018.
- BELTRAME, A. P. S. C. D. A. Avaliação in vitro da eficácia de soluções experimentais de quitosana fosforilada, em PH neutro e alcalino, no controle da erosão dentinária. v., n., p., 2016.
- BERTASSONI, L. E. et al. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. **Caries Research**, v. 43, n. 1, p. 70-77, 2009.
- BEZERRA, S. J. et al. Anti-erosive effect of solutions containing sodium fluoride, stannous chloride, and selected film-forming polymers. **Caries Research**, v. 53, n. 3, p. 305-313, 2019.
- BOLIS, C.; HÄRTLI, G. P.; LENDENMANN, U. Fluoride Varnishes--Is There a Correlation Between Fluoride Release and Deposition on Enamel? **Oral health & preventive dentistry**, v. 13, n. 6, p., 2015.
- CAO, C. Y. et al. Methods for biomimetic remineralization of human dentine: a systematic review. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 4615-4627, 2015.
- CAREY, C. M. Focus on fluorides: update on the use of fluoride for the prevention of dental caries. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 14, n., p. 95-102, 2014.
- CASTELLAN, C. S. et al. Solubility study of phytochemical cross-linking agents on dentin stiffness. **Journal of dentistry**, v. 38, n. 5, p. 431-436, 2010.
- CASTILHO, A. R. F. D. et al. Protective effect of experimental mouthrinses containing NaF and TiF₄ on dentin erosive loss in vitro. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 5, p. 486-490, 2015.
- CHARULATHA, V.; RAJARAM, A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. **Biomaterials**, v. 24, n. 5, p. 759-767, 2003.

CONCEIÇÃO, J. M. D. et al. Fluoride gel supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel erosive wear in situ. **Journal of dentistry**, v. 43, n. 10, p. 1255-1260, 2015.

CUNHA, A. S. S. D.; OLIVEIRA, J. S. D. **Influência da alimentação na incidência de erosão dentária em dentição decídua**. 2020.

DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DE MASI, A. et al Chitosan films for regenerative medicine: Fabrication methods and mechanical characterization of nanostructured chitosan films. **Biophysical reviews**, v. 11, n. 5, p. 807-815, 2019.

DE SIQUEIRA, F. S. F. et al. Improving bonding to eroded dentin by using collagen cross-linking agents: 2 years of water storage. **Clinical oral investigations**, v. 24, n. 2, p. 809-822, 2020.

DE SOUZA, J. C. et al. Influence of nanoparticulated chitosan on the biomodification of eroded dentin: clinical and photographic longitudinal analysis of restorations. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2021.

DECHICHI, P. et al. A model of the early mineralization process of mantle dentin. **Micron**, v. 38, n. 5, p. 486-491, 2007.

DI FOGGIA, M. et al. An in vitro study on dentin demineralization and remineralization: Collagen rearrangements and influence on the enucleated phase. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 193, n., p. 84-93, 2019.

DOS SANTOS FILHO, J. M. et al. Ti: Sapphire femtosecond laser action on the intraradicular dentine: analysis in electronic scan microscopy. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p., 2021.

FONSECA, R. et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 11, p. 1023-1029, 2008.

GAJJERAMAN, S. et al. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1193-1204, 2007.

GANSS, C. et al. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. **Caries Research**, v. 38, n. 6, p. 561-566, 2004.

GANSS, C. et al. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. **Caries Research**, v. 45, n. 6, p. 581-589, 2011.

GANSS, C. et al. Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. **Journal of dentistry**, v. 40, n. 12, p. 1036-1043, 2012.

GANSS, C.; SCHULZE, K.; SCHLUETER, N. Toothpaste and erosion. In: (Ed.). **Toothpastes**: Karger Publishers, 2013. v.23, p.88-99.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Erosion/abrasion-preventing potential of NaF and F/Sn/chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. **Caries Research**, v. 48, n. 2, p. 163-169, 2014.

GOLDBERG, M. et al. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 3, n., p. 711, 2011.

GOMES, R. N. S. et al. ATR-FTIR spectroscopy and μ -EDXRF spectrometry monitoring of enamel erosion caused by medicaments used in the treatment of respiratory diseases. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 2, p. 220-227, 2018.

GOMES, R. N. S. et al. Adverse effects of respiratory disease medicaments and tooth brushing on teeth: A scanning electron microscopy, X-ray fluorescence and infrared spectroscopy study. **Microscopy Research and Technique**, v., n., p., 2019.

HABASHI, W. et al. Three-Dimensional Surface Texture Analysis of Fluoride's Effect on Enamel Erosion. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 19, p. 4528, 2021.

HAMMOUDI, W. et al. Phenotypes of patients with extensive tooth wear—A novel approach using cluster analysis. **Journal of dentistry**, v. 82, n., p. 22-29, 2019.

HASHMI, A.; ZHANG, X.; KISHEN, A. Impact of dentin substrate modification with chitosan-hydroxyapatite precursor nanocomplexes on sealer penetration and tensile strength. **Journal of endodontics**, v. 45, n. 7, p. 935-942, 2019.

HASHMI, A. **Dentin Substrate Modification with Chitosan-Hydroxyapatite Precursor Nanocomplexes**. University of Toronto (Canada), 2019.

HU, D.; REN, Q.; LI, Z.; ZHANG, L. Chitosan-based biomimetically mineralized composite materials in human hard tissue repair. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4785, 2020.

HUYSMANS, M.-C.; YOUNG, A.; GANSS, C. The role of fluoride in erosion therapy. In: (Ed.). **Erosive Tooth Wear**: Karger Publishers, 2014. v.25, p.230-243.

HWANG, J. K.; SHIN, H. H. Rheological properties of chitosan solutions. **Korea-Australia Rheology Journal**, v. 12, n. 3-4, p. 175-179, 2000.

ILLUM, L. et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced drug delivery reviews**, v. 51, n. 1-3, p. 81-96, 2001.

JAEGGI, T.; LUSSI, A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. **Erosive Tooth Wear**, v. 25, n., p. 55-73, 2014.

JONES, G. L. et al. Primary human osteoblast culture on 3D porous collagen-hydroxyapatite scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94, n. 4, p. 1244-1250, 2010.

KANE, R. J. et al. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. **Acta biomaterialia**, v. 17, n., p. 16-25, 2015.

KATO, M. et al. Preventive effect of commercial desensitizing toothpastes on bovine enamel erosion. **Journal of Dental Research**, v. 89, n., p., 2010.

KEEGAN, G. M. et al. Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. **Journal of dentistry**, v. 40, n. 3, p. 229-240, 2012.

KIM, Y. K. et al. Mineralisation of reconstituted collagen using polyvinylphosphonic acid/polyacrylic acid templating matrix protein analogues in the presence of calcium, phosphate and hydroxyl ions. **Biomaterials**, v. 31, n. 25, p. 6618-6627, 2010.

- KISHEN, A. et al. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. **Dental Materials**, v. 32, n. 8, p. 968-977, 2016.
- KITASAKO, Y. et al. The prevalence of non-carious cervical lesions (NCCLs) with or without erosive etiological factors among adults of different ages in Tokyo. **Clinical oral investigations**, v., n., p. 1-9, 2021.
- KÖRNER, P. et al. Potential of different fluoride gels to prevent erosive tooth wear caused by gastroesophageal reflux. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2021.
- KUMARI, S. et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. **Environmental Technology & Innovation**, v. 3, n., p. 77-85, 2015.
- KUNAM, D. et al. Evaluation of dentinal tubule occlusion and depth of penetration of nano-hydroxyapatite derived from chicken eggshell powder with and without addition of sodium fluoride: An in vitro study. **Journal of conservative dentistry: JCD**, v. 19, n. 3, p. 239, 2016.
- LEE, H.-S. et al. Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. **Journal of colloid and interface science**, v. 385, n. 1, p. 235-243, 2012.
- LEÓN-LÓPEZ, A. et al. Hydrolyzed collagen—sources and applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4031, 2019.
- LEUNG, N. et al. 4D microstructural changes in dentinal tubules during acid demineralisation. **Dental Materials**, v., n., p., 2021.
- LIN, K. et al. Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine. **Advanced Functional Materials**, v. 29, n. 3, p. 1804943, 2019.
- LOPES, R. M. et al. In situ evaluation of desensitizing toothpastes for protecting against erosive tooth wear and its characterization. **Clinical oral investigations**, v., n., p. 1-14, 2021.
- LUSSI, A.; JÄGGI, T. Erosion—diagnosis and risk factors. **Clinical oral investigations**, v. 12, n. 1, p. 5-13, 2008.
- LUSSI, A. et al. Dental erosion—an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Research**, v. 45, n. Suppl. 1, p. 2-12, 2011.
- LUTOLF, M. P.; GILBERT, P. M.; BLAU, H. M. Designing materials to direct stem-cell fate. **Nature**, v. 462, n. 7272, p. 433-441, 2009.
- MEIRA, I.-A. Erosive effect of industrialized fruit juices exposure in enamel and dentine substrates: An in vitro study. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 13, n. 1, p. e48, 2021.
- MONÁRREZ-CORDERO, B. E. et al. The effect of *Allium cepa* extract on the chitosan/PLGA scaffolds bioactivity. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 19, n., p. 2280800021989701, 2021.
- NAHORNY, S. et al. Multi-walled carbon nanotubes/graphene oxide hybrid and nanohydroxyapatite composite: A novel coating to prevent dentin erosion. **Materials Science and Engineering: C**, v. 79, n., p. 199-208, 2017.

- NAHÓRNY, S.; DE OLIVEIRA, I. R.; SOARES, L. E. S. Combined morphological-compositional analysis of the interaction of collagen and chitosan based-materials with demineralized bovine dentin. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 44670-44679, 2021.
- NISHI, N. et al. Preparation and characterization of water-soluble chitin phosphate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 6, n. 1, p. 53-54, 1984.
- NIU, L.-N. et al. Biomimetic remineralization of dentin. **Dental Materials**, v. 30, n. 1, p. 77-96, 2014.
- NUDELMAN, F. et al. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. **Nature materials**, v. 9, n. 12, p. 1004-1009, 2010.
- NURUNNABI, M. et al. Polysaccharide based nano/microformulation: an effective and versatile oral drug delivery system. In: (Ed.). **Nanostructures for Oral Medicine**: Elsevier, 2017, p.409-433.
- O'TOOLE, S. et al. Timing of dietary acid intake and erosive tooth wear: a case-control study. **Journal of dentistry**, v. 56, n., p. 99-104, 2017.
- PARK, K.-J.; SCHNEIDER, H.; HAAK, R. Assessment of interfacial defects at composite restorations by swept source optical coherence tomography. **Journal of biomedical optics**, v. 18, n. 7, p. 076018, 2013.
- PINI, N. et al. In vitro efficacy of experimental chitosan-containing solutions as anti-erosive agents in enamel. **Caries Research**, v. 50, n. 3, p. 337-345, 2016.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, n., p. 957-971, 2015.
- PRESCOTT, R. S. et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. **Journal of endodontics**, v. 34, n. 4, p. 421-426, 2008.
- PRESTES, R. C. et al. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Rev Bras Prod Agroindustr [Internet]**, v. 15, n. 4, p. 375-382, 2013.
- REDDY, A. et al. The pH of beverages in the United States. **The Journal of the American Dental Association**, v. 147, n. 4, p. 255-263, 2016.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.
- ROCHA, C. T. et al. Erosão dental na infância e sua associação com o refluxo gastroesofágico. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 11, n. 2, p. 305-310, 2011.
- RODRIGUES, L. O. et al. Produção de biofilme de quitosana, reduzida da quitina, extraída de exoesqueleto de crustáceos: proposta e disponibilização sustentável. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 1, p. 218-239, 2020.
- RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M. et al. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine. **BioMed research international**, v. 2015, n., p., 2015.
- SARIALIOGLU GUNGOR, A.; DONMEZ, N. Dentin erosion preventive effects of various plant extracts: An in vitro atomic force microscopy, scanning electron microscopy, and nanoindentation study. **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 5, p. 1042-1052, 2021.

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

SCHLÜTER, N. et al. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. **Caries research**, v. 45, n. Suppl. 1, p. 13-23, 2011.

SHEKHTER, A. B. et al. Medical applications of collagen and collagen-based materials. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 3, p. 506-516, 2019.

SHELLIS, R. P.; ADDY, M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. In: (Ed.). **Erosive Tooth Wear**: Karger Publishers, 2014. v.25, p.32-45.

SILVA, T. F. D.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v., n., p. 530-539, 2012.

SILVER, F. H.; LANDIS, W. J. Deposition of apatite in mineralizing vertebrate extracellular matrices: A model of possible nucleation sites on type I collagen. **Connective tissue research**, v. 52, n. 3, p. 242-254, 2011.

SOARES, L. E. S. et al. Erosion effects on chemical composition and morphology of dental materials and root dentin. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 703-710, 2012.

SOARES, L. E. S.; DO ESPÍRITO SANTO, A. M. Morphological and chemical comparative analysis of the human and bovine dentin–adhesive layer. **Microscopy and Microanalysis**, v. 21, n. 1, p. 204-213, 2015.

SOARES, L. E. S. et al. Chemical and morphological evaluation of enamel and dentin near cavities restored with conventional and zirconia modified glass ionomer subjected to erosion-abrasion. **Microscopy Research and Technique**, v., n., p., 2019.

SOARES, L. E. S. et al Raman spectroscopy-multivariate analysis related to morphological surface features on nanomaterials applied for dentin coverage. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 228, n., p. 117818, 2020.

SOUZA, B. M. et al Effect of chitosan solutions with or without fluoride on the protection against dentin erosion in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, v. 128, n. 6, p. 495-500, 2020.

SUMITA, Y. et al. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 17, p. 3238-3248, 2006.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 1127-1137, 2008.

TIAN, K. et al. Induced synthesis of hydroxyapatite by chitosan for enamel remineralization. In: *Advanced Materials Research*, 2012 *Trans Tech Publ*, p. 40-45.

TJÄDERHANE, L. et al. Dentin basic structure and composition—an overview. **Endodontic Topics**, v. 20, n. 1, p. 3-29, 2009.

TSCHAMMLER, C. et al. Erosive tooth wear and caries experience in children and adolescents with obesity. **Journal of dentistry**, v. 83, n., p. 77-86, 2019.

URURAHY, M. S. et al. Wettability and surface morphology of eroded dentin treated with chitosan. **Archives of Oral Biology**, v. 75, n., p. 68-73, 2017.

VAN GULICK, L. et al. Age-related changes in molecular organization of type I collagen in tendon as probed by polarized SHG and Raman microspectroscopy. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

WALRAND, S. et al. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7790-7795, 2008.

WANG, Y.-L. et al. Effects of fluoride and epigallocatechin gallate on soft-drink-induced dental erosion of enamel and root dentin. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 117, n. 4, p. 276-282, 2018.

WEGEHAUPT, F. et al. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? **Journal of oral rehabilitation**, v. 35, n. 5, p. 390-394, 2008.

XU, Z. et al. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 98, n. 1, p. 150-159, 2011.

YOKOGAWA, Y. et al. Growth of calcium phosphate on phosphorylated chitin fibres. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, n. 7, p. 407-412, 1997.

YOO, T. K.; HAN, S.-H.; HAN, J. Protective effects of biodegradable collagen implants on thinned sclera after strabismus surgery: a paired-eye study. **Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus**, v. 21, n. 6, p. 467-471. e461, 2017.

YU, L.; WEI, M. Biomineralization of collagen-based materials for hard tissue repair. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 2, p. 944, 2021.

ZHANG, J. et al. Remineralisation of enamel white spot lesions pre-treated with chitosan in the presence of salivary pellicle. **Journal of dentistry**, v. 72, n., p. 21-28, 2018.

ZHENG, B. et al. Phosphorylated chitosan to promote biomimetic mineralization of type I collagen as a strategy for dentin repair and bone tissue engineering. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 2002-2010, 2019.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da Aplicação do Laser de Diodo na Prevenção e Controle da Erosão Dentária Extrínseca", registrada com o protocolo nº A03/CEUA2019, sob a responsabilidade de Luis Eduardo Silva Soares que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em reunião de 23 / 04 / 2019.

- Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 27/05/2019 a 28/02/2019
- Espécie/linhagem/raça: grandes animais (equinos, bovinos, suínos ou pequenos ruminantes) e pequenos animais (cães e gatos).
- Nº de animais autorizados: 5
- Peso/Idade: não se aplica
- Sexo: impossível prever, (de acordo com a disponibilidade)
- Origem (fornecedor): Frigorífico Mondelli Industria de Alimentos S/A. CNPJ 45.007.630/0004-79

Cristina Pacheco Soares
Prof. Dra. Cristina Pacheco Soares

Coordenadora CEUA-UNIVAP

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
IP&D - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova CEP 12244-000 PABX(012) 349.1000 FAX(012) 349.1252 Caixa Postal 82 S.J.Campos-SP

Email: ceua@univap.br