

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

GISELE FERNANDES DIAS

EFEITO DA DOLOMITA E DA CASEÍNA FOSFOPEPTÍDEA FOSFATO DE CÁLCIO
AMORFO NAS PROPRIEDADES QUÍMICO-MECÂNICAS DA DENTINA DECÍDUA
DESMINERALIZADA

PONTA GROSSA
2016

GISELE FERNANDES DIAS

EFEITO DA DOLOMITA E DA CASEÍNA FOSFOPEPTÍDEA FOSFATO DE CÁLCIO
AMORFO NAS PROPRIEDADES QUÍMICO-MECÂNICAS DA DENTINA DECÍDUA
DESMINERALIZADA

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor na Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Área de concentração em
Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Fábio André dos
Santos

PONTA GROSSA
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

D541 Dias, Gisele Fernandes
 Efeito da dolomita e da caseína
 fosfopeptídea fosfato de cálcio amorfo nas
 propriedades químico-mecânicas da dentina
 decídua desmineralizada/ Gisele Fernandes
 Dias. Ponta Grossa, 2016.
 111f.

 Tese (Doutorado em Odontologia - Área
 de Concentração: Clínica Integrada),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Fábio André dos
 Santos.

 1.Cimentos de ionômeros de vidro.
 2.Dentina. 3.Desmineralização.
 4.Remineralização dentária. I.Santos,
 Fábio André dos. II. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em
 Odontologia. III. T.

CDD: 617.6

DADOS CURRICULARES

Gisele Fernandes Dias

NASCIMENTO	30.11.76 Maringá-Paraná
FILIAÇÃO	Luiz Gonzaga Dias Maria Guaraciaba Fernandes Dias
1996 - 2001	Curso de Graduação em Odontologia Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) Florianópolis – Santa Catarina
2002	Aperfeiçoamento em Periodontia e Cirurgia Bucal Associação Brasileira de Odontologia (ABO) Curitiba - Paraná
2002 - 2004	Residência Multiprofissional em Saúde da Família Universidade Federal do Paraná (UFPR) Curitiba - Paraná
2006	Aperfeiçoamento em Ortodontia Preventiva e Diagnóstico Universidade Positivo (UNICENP) Curitiba – Paraná
2009 - 2011	Especialização em Odontopediatria Universidade Federal do Paraná (UFPR) Curitiba – Paraná
2012 - 2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia Nível Mestrado Área de concentração em Clínica Integrada Linha de Pesquisa: Prevenção em Odontologia Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) Ponta Grossa – Paraná
2014 - em andamento	Curso de Pós-Graduação em Odontologia Nível Doutorado Área de concentração em Clínica Integrada Linha de Pesquisa: Epidemiologia e Diagnóstico Bucal Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) Ponta Grossa – Paraná

GISELE FERNANDES DIAS

**EFEITO DA DOLOMITA E DA CASEÍNA FOSFOPEPTÍDEA FOSFATO DE
CÁLCIO AMORFO NAS PROPRIEDADES QUÍMICO-MECÂNICAS DA DENTINA
DECÍDUA DESMINERALIZADA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Odontologia pela
Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Doutorado em Odontologia
Área de concentração: Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 26 de Agosto de 2016.

Prof. Dr. Fábio André dos Santos
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dra. Estela Maris Losso
Universidade Positivo

Prof. Dra. Thais Regina Kummer Ferraz
Centro Universitário de União da Vitória - UNIUV

Prof. Dr. César A. Arrais / UEPG
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dra. Vania Aparecida Oliveira Queiroz
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

A Deus, muito obrigada por me conceder concluir esta etapa profissional.

À Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, por me conduzir em todos os momentos.

À minha amada família: Luís Henrique, Cecília e Lígia. Por tanto amor e paciência.

Aos meus pais Luiz e Guaraciaba, minha gratidão eterna por me direcionarem na estrada da vida.

Aos meus irmãos Cibele e Júnior, fontes de amor e amizade.

Aos meus sobrinhos Natália e Daniel, meus primeiros pacientes.

À minha secretária Rute, por todo carinho e cuidado com as minhas filhas durante minhas ausências.

Ao meu orientador Dr. Fábio André pela presença, orientação e auxílio imediatos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação da UEPG por toda presteza e formação.

Às Professoras: Dra. Fabiana e Dra. Gislaíne, parceiras da Disciplina de Odontopediatria da UEPG. Meu carinho.

À Professora *in memoriam*: Dra. Eunice Kuhn, por me incentivar a concluir o Doutorado, independente das dificuldades do caminho.

Aos Amigos: Thais e Sérgio Paulo, parceiros da Disciplina de Ortopediatria da UNIUV. Fiéis escudeiros.

Aos Professores: Dr. César e Dr. José Vitor, Mestres que tanto contribuíram no exame de Qualificação.

Aos meus alunos, toda minha dedicação.

Aos colegas da Pós-Graduação, obrigada pelos bons momentos.

A todos que auxiliaram na concretização deste trabalho.

Aos meus pequenos pacientes.

Gratidão.

*“Recria tua vida sempre, sempre.
Remove pedras, planta roseiras e faz doces. Recomeça.”
Cora Coralina*

Dias GF. Efeito da dolomita e da caseína fosfopeptídea fosfato de cálcio amorfo nas propriedades químico-mecânicas da dentina decídua desmineralizada. [Tese de Doutorado em Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da dolomita(DMT) e caseína fosfopeptídea fosfato de cálcio amorfo(CPP-ACP) nas propriedades químico-mecânicas da dentina decídua desmineralizada. Para o experimento 1: foram analisados a toxicidade, propriedades químicas e liberação de íons cálcio e magnésio, com bioensaio com *Artemia Salina*, potencial hidrogeniônico(pH), difração(DRX) e fluorescência de raios X(FRX) de 4 amostras de DMT e do hidróxido de cálcio PA ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Nos experimentos 2 e 3, *in vitro*, avaliou-se em dentina hígida e desmineralizada, a ação potencial de remineralização da DMT em pó e do CPP-ACP selados com cimento de ionômero de vidro(CIV) de alta viscosidade. Em 80 molares decíduos foram realizadas cavidades classe I. Os dentes foram divididos em grupos 1 e 2/ (ciclagem de pH) e DMT; CPP-ACP. Após ciclagem de pH(n=40) a metade cavitária foi isolada com esmalte, obtendo-se dois sítios, um de contato direto com o CIV e outro controle. Formou-se 4 grupos, de acordo com o material empregado e a condição dentinária. Os dentes restaurados foram fatiados (fatias de n=3) no sentido mésio-distal. Os dados de dureza foram analisados considerando as áreas de contato(C) e sem contato(SC), com ANOVA 2 critérios pós-teste de Bonferroni para os fatores dentina(hígida e desmineralizada), tratamento(sem e com tratamento) e interação(dentina e tratamento). O nível de significância empregado foi de 5%($\alpha=0,05$). Os dados do espectroscopia de energia dispersiva(EDS), FEG(microscópio eletrônico de varredura de alta resolução) e Micro Raman foram analisados por grupos. Resultados experimento 1: DRX e FRX detectaram a presença de elementos além da DMT pura e o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ correspondeu às expectativas de aproximadamente 100% de portlandita. O teste de toxicidade resultou em valores atóxicos das DMTs. O teste do pH enquadrou as DMTs no padrão de alcalinidade. Houve liberação significativa de íons cálcio(Ca) e magnésio(Mg). Resultados experimento 2: área SC diferença significativa foi encontrada para o fator dentina ($p=0,0001$). A interação dentina e tratamento não foi significativa ($p=0,238$). Área C: não houve diferença significativa em relação à dentina ($p=0,391$). No entanto, a área de contato direto CIV/DMT houve diferença significativa na interação dentina e tratamento ($p=0,001$). Resultados experimento 3: os valores de dureza aumentaram na área C para em todos os grupos ($p<0,001$); não houve alteração significativa em valores de dureza após a aplicação de CPP-ACP ($p>0,05$). Na avaliação do FEG e EDS, o contato direto da dentina desmineralizada/CPP-ACP/CIV resultou no aumento de pico do íon fósforo(P). As alterações em dureza ocorreram pelo contato direto do material com a superfície dentinária (dentina e tratamento). A dentina desmineralizada foi o substrato mais reativo nos experimentos 2 e 3. O experimento1 conclui que a DMT é atóxica, pH alcalino e libera íons Ca. O experimento 2 conclui que A DMT isolada determinou melhora do substrato dentinário desmineralizado de repercussão nas propriedades químicas-mecânicas da dentina desmineralizada. O experimento 3 conclui que o CPP-ACP associado ao CIV promoveu o incremento do íon P. As trocas iônicas entre CIV, CPP-ACP e dentina desmineralizada promoveram mudanças das propriedades químicas do substrato dentinário.

Palavras-chave: Cimentos de ionômeros de vidro, dentina, desmineralização, remineralização dentária.

DIAS GF. Dolomite and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate effect in demineralized dentin deciduous sealed with glass ionomer. [Tese de Doutorado em Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of dolomite (DMT) and casein fosfopeptídea amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) in chemical and mechanical properties of demineralized dentin deciduous. For the experiment 1: analyzed the toxicity, chemical properties and release of calcium (Ca) and magnesium (Mg) ions with bioassay *Artemia Salina*, hydrogen potential (pH), diffraction (XRD) and X-ray fluorescence (XRF) of 4 samples of DMT and calcium hydroxide PA ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). For the experiments 2 and 3 in vitro evaluated in sound and demineralized dentin the action potential of remineralization of DMT powder and in CPP-ACP sealed with glass ionomer cement (GIC) of high viscosity. In 80 primary molars were performed cavities class I. The teeth were divided into groups 1 and 2 / (pH cycling) and DMT; CPP-ACP. After pH cycling (n = 40) the cavity half was insulated with enamel, obtaining two places a direct contact with the GIC and other control. 4 groups were formed according to the material used and dentin condition. The restored teeth were sliced (slices of n = 3) in the mesial-distal direction. The hardness data were analyzed considering the contact areas (C) and no contact (NC), with ANOVA 2 Bonferroni post-test criteria for dentine factors (sound and demineralized), treatment (with and without treatment) and interaction (treating and dentin). The level of significance used was 5% ($\alpha = 0.05$). Data from energy dispersive spectroscopy (EDS), electron microscope high resolution scan (FEG) and Micro Raman were analyzed by groups. Results Experiment 1 : XRD and XRF detected the presence of elements in addition to pure DMT and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ to expectations of approximately 100% portlandite. The toxicity test resulted in non-toxic amounts of DMTs. The test pH DMTs in the framed pattern alkalinity. There was a significant release of Ca and Mg ions. Results Experiment 2: area NC significant difference was found for the dentin factor (p = 0.0001). The interaction dentin and treatment was not significant (p = 0.238). Area C: there was no significant difference in relation to dentin (p = 0.391). However, the direct contact area of GIC/DMT was no significant difference in the interaction dentin and treatment (p = 0.001). Results Experiment 3: hardness values increased in area C for all groups (p < 0.001); no significant change in hardness values after the application of CPP-ACP (p > 0.05). In the evaluation of the FEG and EDS, the direct contact of demineralized dentin/CPP-ACP/GIC resulted in increased peak phosphorus (P) ion. Changes in hardness occurred by direct contact of the material with the dentin surface (dentin and treatment). The demineralized dentin was the most reactive substrate in experiments 2 and 3. The experiment1: we conclude that the DMT is non-toxic, alkaline pH and releases Ca ions. Experiment 2: Isolated DMT determined improvement of demineralized dentin with effect on chemical and mechanical properties of demineralized dentin. Experiment 3: CPP-ACP associated with GIC promoted the increase of P ion. The ionic exchange between GIC, CPP-ACP and demineralized dentin induced changes in the chemical properties of the dentin.

Keywords: glass ionomer cements, dentin, desmineralization, tooth remineralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Desenho Experimental.....	18
Figura 2 -	Corte sagital (A, B) dos dentes restaurados com CIV nas duas condições: dentina hígida (G1, G1 DMT) e desmineralizada (G2, G2 DMT) Camada de esmalte vermelho para evitar contato direto do CIV com a metade da dentina, para obter área de controle e área teste.	23
Figura 3 -	Preparo das cavidades Classe I.....	24
Figura 4 -	Aplicação da DMT em pó na cavidade dentinária após procedimentos de ciclagem de pH.....	25
Figura 5 -	Imagem digital obtida durante o mapeamento da região dentinária obtida em 3 pontos de análise (0µm, 45 µm e 90 µm) da base cavitária. Espectroscopia de Micro-Raman.....	28
Figura 6 -	Corte sagital dos dentes restaurados com CIV nas duas condições: dentina hígida e desmineralizada (G1, G2) submetidos à aplicação tópica de CPP-ACP. (G1CPP-ACP, G2CPP-ACP).....	30
Figura 7 -	A-Preparo cavidades Classe I ; B-cavidade preparada; C-espécime preparado para ciclagem de pH; D- procedimento de ciclagem de pH; E – CPP-ACP Mi Paste.....	32

LISTA DE SIGLAS

C	Contato
ceo-d	Índice odontológico para dentição decídua
CIV	Cimento de Iônomero de vidro
CPP-ACP	Caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo
TPI	Tratamento pulpar indireto
DMT	Dolomita
DRX	Difração de Raios X
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
FEG	Microscópio eletrônico de varredura de alta resolução
FRX	Fluorescência de Raios X
NC	Não contato
SC	Sem contato
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca	cálcio
CaF ₂	fluoreto de cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
Ca(CO ₃) ₂	carbonato de cálcio
CaMg (CO ₃) ₂	carbonato de cálcio e magnésio
Ca (OH) ₂	hidróxido de cálcio
cm	centímetros
F	flúor
g	gramas
gF	grama força
GeV	giga eletrôn-volt
h	hora
KCl	cloreto de potássio
Kv	quilovoltz
MgF ₂	fluoreto de magnésio
NaF	fluoreto de sódio
Na ₂ PO ₄	fosfato de sódio
mA	miliamperagem
min	minutos
Mg	magnésio
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
min	minutos
mW	miliwatts
Ni	nitrogênio
P	fósforo
Pa	pascal
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
PVC	policloreto de vinila
keV	mil elétrons-volt
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SiO	quartzo
%	porcentagem
µm	micrômetros
X	vezes
Kx	unidade de magnificação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	PROPOSIÇÃO	16
2.1	PROPOSIÇÃO GERAL	16
2.2	PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	EXPERIMENTO 1	18
3.1.1	Delineamento Experimental	18
3.1.2	Toxicidade	19
3.1.3	Análise do potencial Hidrogeniônico (pH)	19
3.1.4	Liberação de íons cálcio e magnésio	20
3.1.5	Difração de raios X (DRX)	20
3.1.6	Fluorescência de raios X (FRX)	21
3.2	EXPERIMENTO 2	22
3.2.1	Delineamento Experimental	22
3.2.2	Preparo das cavidades Classe I	23
3.2.3	Procedimentos para ciclagem de pH	24
3.2.4	Aplicação tópica da DMT em pó	25
3.2.5	Procedimentos restauradores	26
3.2.6	Preparo dos espécimes	26
3.2.7	Teste de Microdureza	27
3.2.8	Avaliação dos íons em dentina por microscopia eletrônica de campo (FEG)	27
3.2.9	Espectroscopia Micro-Raman	28
3.3	EXPERIMENTO 3	29
3.3.1	Delineamento Experimental	29
3.3.2	Preparo Cavidades Classe I	30
3.3.3	Procedimento de ciclagem de pH	31
3.3.4	Aplicação tópica da Pasta Mi	31
3.3.5	Procedimento Restaurador	32
3.3.6	Preparo dos espécimes	33
3.3.7	Teste de Microdureza	33
3.3.8	Avaliação dos íons em dentina pela microscopia eletrônica de campo (FEG) e espectroscopia de raios X (EDS)	34
4	ARTIGOS	35
4.1	Avaliação da toxicidade e propriedades químicas da dolomita para uso na odontologia	37
4.2	Efeito do pré-tratamento com dolomita em pó na dentina desmineralizada de molares decíduos	58
4.3	Chemical exchange between dentin pre-treatment with CPP-ACP and GIC on demineralized dentin in deciduous molars	81
5	DISCUSSÃO	101
6	CONCLUSÃO	103

REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	108

1 INTRODUÇÃO

A prevalência de cárie permite mensurar a experiência da doença de uma determinada população, ou seja, a porcentagem de crianças que apresentam um ou mais dentes acometidos por lesões de cárie (Duque et al., 2009¹; Ricketts et al., 2006²). De acordo com o pesquisa Nacional de Saúde Bucal 2010, aos 5 anos de idade uma criança brasileira possui, em média, o índice ceo-d de 2,43 dentes com experiência de cárie com predomínio do componente cariado, o qual é responsável por mais de 80% do índice (Brasil, 2010³). O Brasil ainda é considerado um dos países com maior índice de cárie no mundo.

A doença cárie é causada pelo desequilíbrio mineral entre os tecidos dentários e o meio fluido bucal (Fuks et al., 2013⁴). As lesões de cárie são os sinais deste desequilíbrio, caracterizadas em escala desde nível molecular até a destruição completa do dente (Pinheiro et al., 2003⁵). O diagnóstico se dá a partir da inspeção visual das superfícies dentárias, ao verificar alterações de cor, textura e brilho, os quais identificam a presença de perdas minerais (Uusoy et al, 2014⁶; Marghalani, Omar, Chen, 2014⁷). As lesões podem ser classificadas em dentina infectada e dentina afetada, baseada na extensão e reversibilidade do dano induzido (Fuks et al., 2013⁴). Em dentina infectada, a matriz orgânica está irreversivelmente danificada, enquanto que a dentina afetada profunda é desmineralizada de matriz orgânica hígida, a qual pode ser reparada e remineralizada (Uusoy et al, 2014⁶). A progressão lenta da cárie permite a intervenção reparadora, a qual pode restaurar a arquitetura mineralizada após a escavação da camada infectada.

É importante ressaltar, que estudos que promovam a abordagem destas lesões de forma não-invasiva são baseados em conceitos de Mínima Intervenção (MI), dentre eles por meio de monitoramento de lesões incipientes para preservar estrutura dental sadia e remoção parcial de tecido cariado (Fuks et al., 2013⁴). Com intuito de atender às demandas atuais de tratamento restaurador com mínima intervenção, a busca por materiais restauradores consiste em aliar a capacidade de selamento e indução de reparo em dentina afetada remanescente. Portanto, ao lidarmos com dentes decíduos, a manutenção da dentina afetada por cárie está direcionada às lesões profundas devido ao risco iminente de exposição pulpar. Tanto o risco quanto a iminência de comprometimento pulpar durante o procedimento de

remoção de dentina cariada em dentes decíduos faz com que o tratamento pulpar indireto (TPI) seja uma alternativa para dentes decíduos com lesões de cárie profunda (Fuks et al., 2013⁴; Pinheiro et al., 2003⁵).

A busca por biomateriais capazes de aprimorar as propriedades químico-mecânicas do substrato desmineralizado utilizado em contato com sistema biológico, a partir da interação química com a dentina, tem por finalidade promover o reparo tecidual. De modo que, a busca por tecnologias de remineralização baseadas em alternativas não-invasivas pode ser a chave para o gerenciamento das lesões de cárie. Na atualidade, o grande desafio da dentística restauradora reside na tentativa de melhorar a condição do substrato dentinário desmineralizado para receber o material restaurador, com vistas à promoção da longevidade das restaurações. Na Odontologia, novos produtos são constantemente lançados no mercado, utilizados em íntimo contato com tecidos biológicos. No entanto, há necessidade de conhecer as características e propriedades físico-químicas e mecânicas destes produtos para aumentar significativamente o uso clínico dos biomateriais.

O estudo das trocas químicas entre materiais bioativos e tecidos dentais tem sido tema de pesquisas, bem como as alterações das propriedades físico-química das estruturas dentárias envolvidas (Ngo et al., 2006⁸). Portanto, o propósito deste estudo foi apresentar a caracterização de um potencial biomaterial para aplicação odontológica no tratamento conservador pulpar: a dolomita brasileira Gran-White mineral (DMT). Em seguida, avaliar as trocas minerais e repercussões nas propriedades químico-mecânicas da dentina decídua desmineralizada, ao empregar como pré-tratamento ao cimento de ionômero de vidro (CIV) dois biomateriais não-comumente utilizados para aplicação em dentina: a (DMT) e caseína fosfopeptídea - fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) na apresentação comercial Mi Paste®.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 PROPOSIÇÃO GERAL

2.1.1 Caracterizar a DMT para potencial utilização como material odontológico e avaliar *in vitro* a permuta química e suas repercussões químico-mecânicas em dentina decídua desmineralizada sob a ação de pré-tratamento com os materiais (DMT e CPP-ACP) por meio dos testes laboratoriais.

2.2 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

2.2.1 Identificar, quantificar percentual em massa e confirmar a estrutura e fases cristalinas das DMTs utilizadas.

2.2.2 Avaliar toxicidade e propriedades químicas das DMTs utilizadas.

2.2.1 Quantificar alterações em dureza da dentina decídua hígida e desmineralizada, após contato com CIV e os materiais DMT e CPP-ACP por meio de Dureza Knoop.

2.2.2 Quantificar alterações minerais em relação ao conteúdo de flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo (P) envolvidos nas trocas iônicas entre CIV, substrato dentinário hígido e desmineralizado, com os materiais DMT e CPP-ACP por meio de EDS (Espectroscopia de Raios X).

2.2.3 Comparar o conteúdo de F, Ca, e P envolvidos nas trocas iônicas entre CIV, substrato dentinário hígido e desmineralizado, com os materiais DMT e CPP-ACP e suas repercussões nas propriedades químico-mecânicas por meio de EDS e Espectroscopia de Micro Raman.

2.2.4 Caracterizar os produtos formados em substrato dentinário por meio de Espectroscopia de Micro Raman.

2.2.5 Obter imagens relativas aos procedimentos efetuados em FEG (Espectroscopia de Campo Backscatter) para investigar aspectos morfológicos da cárie artificial e tratamentos realizados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO 1

Avaliação da toxicidade e propriedades químicas da dolomita para uso na odontologia

3.1.1 Delineamento experimental

Quatro amostras de dolomita (DMT) encontradas no mercado de produtos naturais foram analisadas: Bioficina® DMT I, Flora Pinhais® DMT II, Dolomitex® DMT III e Gran-White DMT IV e hidróxido de cálcio PA-HCa (Biodinâmica®) (Figura 1), quanto à toxicidade, pH, liberação de íons cálcio e magnésio, caracterização estrutural por meio de difração e fluorescência de raios X.

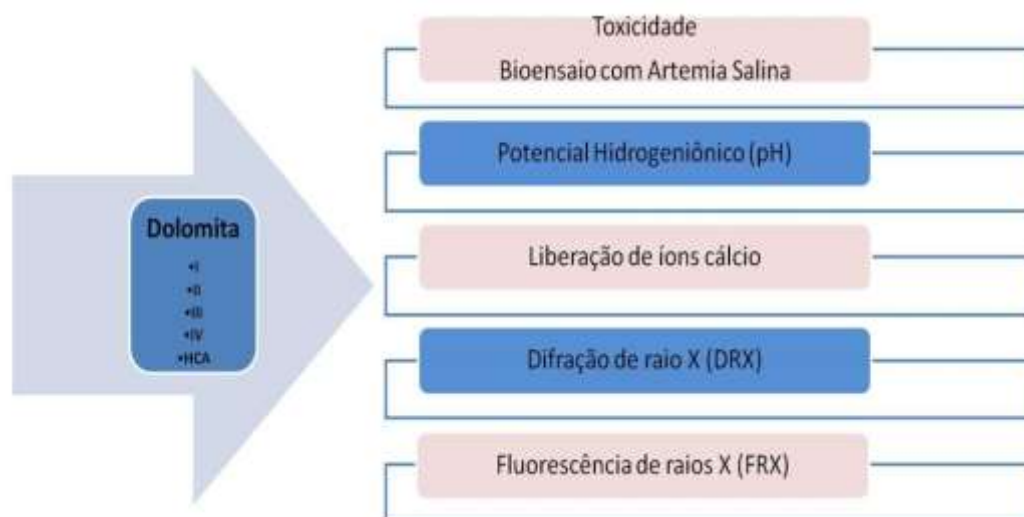


Figura 1 – Desenho Experimental

3.1.2 Toxicidade - Bioensaio com *Artemia Salina*: para a determinação da toxicidade, realizou-se o método alternativo da estimativa da concentração letal 50 (CL50), no modelo de *Artemia salina* baseada na técnica descrita por Meyer et al. (1982)¹⁶. Foi colocado 100 mg de ovos de *Artemia* em água salinizada na

proporção de 38g de sal marinho por litro; a temperatura foi mantida entre 28 a 30°C; pH entre 8 e 9 e iluminação artificial. O estado de saturação de oxigênio foi conseguido com auxílio de uma bomba de oxigenação. Após 48 horas, as larvas atingiram o estágio de metanúplio do microcrustáceo, que é mais sensível ao tratamento. As 10 larvas (n = 10) em cada tubo ensaio com 5 mL da solução salina nas concentrações larvas não foram alimentadas. O bioensaio com *Artemia salina* consiste em distribuir gradualmente 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750 e 1000 concentrações ug/mL de cada amostra. As larvas de *A. salina* foram incubadas nas diversas concentrações do extrato bruto dissolvido durante 24h sob iluminação artificial e temperatura controlada para eclodirem. Posteriormente, foram transferidas 10 larvas para tubos de ensaio contendo solução salina (controle negativo), dicromato de potássio 0,1% (controle positivo) e a dolomita em diferentes concentrações. O resultado foi obtido contando-se o número de metanúplios do microcrustáceo mortos e vivos em cada tubo de ensaio, após 24 e 48 horas por meio de visualização macroscópica com lupa. A análise estatística descritiva foi feita com a contagem do número de sobreviventes, calculando-se a porcentagem de mortos. Os microcrustáceos foram considerados mortos quando não exibiam nenhum movimento após 10 segundos de observação¹⁶. Para o cálculo da toxicidade determinou-se a CL50, a concentração de agente tóxico que causa a mortalidade de 50% dos organismos expostos no período de 24 ou 48 horas. A estimativa realizada foi pela Análise de Regressão de Probit, a qual é apropriada para conjuntos de dados em que a variável dependente é medida em unidades do tipo Sim ou Não. Neste caso, a resposta é representada pela porcentagem de sobreviventes, nascidos, etc. O teste foi realizado em duplicata.

3.1.3 Análise do potencial Hidrogeniônico (pH): foram utilizadas amostras por diluição da dolomita e de hidróxido de cálcio (controle) em água destilada, sendo a quantidade de pó em diferentes proporções. Cada grupo foi subdividido em mais cinco grupos, cada um contendo uma quantidade µg de dolomita num mesmo volume de água destilada (1mL) nas seguintes concentrações: 1000 µg/mL; 750 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL e 100 µg/mL. Inicialmente, mediu-se o pH da água destilada. Após, foram pegadas as amostras por diluição e feita a aferição do pH inicial (0) e nos períodos de 24 e 168 horas, considerando que nesse período as

amostras foram armazenadas em estufa à 37°C. Entre uma leitura e outra, o eletrodo do pH- metro foi lavado com água destilada e secado com papel. A água destilada e deionizada foi utilizada devido à sua pureza e o pH neutro¹⁷. Para análise do pH foi utilizada a análise Anova 1 fator com pós teste de Tukey. Adotou-se um nível de significância $p < 5\%$, utilizou-se o *software* GraphPad Prism 5.0.

3.1.4 Liberação de íons cálcio e magnésio: foi utilizado o método de absorção atômica, que se fundamenta na solubilização das fontes de cálcio (Ca) que estão presentes na amostra com ácido concentrado para determinar a concentração do elemento Ca. Primeiramente, foi transferido 0,500g de cada dolomita para béqueres de 100mL. Após, foi adicionado 20mL de ácido clorídrico (HCl) 1+1 e fervido por 10 minutos, após foram transferidos para balões volumétricos de 100mL e completado o volume com água destilada. Foi tomado uma alíquota do extrato das DMTs e transferido para balões de 50mL. Adicionado 5mL de óxido de lantânio a 5% e completado o volume com água. O lantânio foi adicionado pela capacidade de eliminar as interferências de outros íons. Após a confecção da amostra, o espectrômetro de absorção atômica com chama foi colocado nas condições exigidas para a determinação do Ca, conforme o manual de operação. O aparelho foi calibrado e a leitura imediata foi realizada. O bulk é o padrão que se usa para fazer a curva do equipamento, para que tenhamos uma referência de valor de Ca e Mg, sendo 10,25 ppm e 2,04 ppm, respectivamente. Os valores foram anotados em uma planilha de Excel.

3.1.5 Difração de raios X (DRX): os dados de difração de raios foram coletados em um difratômetro Shimadzu XRD 6000, operando com tubo de cobre a 40 kV e 30 mA. Foram utilizadas fendas de divergência e espalhamento iguais a 1° e fenda de recepção igual a 0,15 mm. A radiação $k\beta$ foi eliminada por uso de monocromador de grafite. A varredura foi realizada no alcance de 3° a 120° em modo de varredura contínua, na razão de 1 grau/min. As identificações das fases cristalinas presentes nas amostras foram realizadas por meio de comparação entre o padrão de difração simulado a partir de arquivos de informação cristalográfica (crystallographic information file – cif), obtidos no Banco de Dados de Estruturas Cristalinas Inorgânicas (Inorganic Crystal Structure Database - ICSD) via Base de Estruturas Cristalinas e o padrão observado. Os perfis de difração simulados foram

obtidos utilizando-se os programas GSAS+ExpGui^{18,19}. Neste trabalho foram utilizados os modelos estruturais das fichas ICSD #10404 para a DMT ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), ICSD #1011159 para o quartzo (SiO_2), ICSD #18166 para o carbonato de cálcio (CaCO_3) e ICSD #1001768 para a portlandita ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). As análises de Rietveld foram realizadas utilizando-se os programas GSAS+ExpGui. Utilizou-se a função de perfil pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings²⁰ para o ajuste dos picos de difração. O modelo fenomenológico de Peter Stephens (1999)²¹ incorporado à função de perfil permitiu o ajuste do alargamento anisotrópico dos picos de difração. Para a análise quantitativa de fases foi adotado o modelo de Howard e Hill (1987)²². A qualidade dos refinamentos foi monitorada por análise visual do gráfico de Rietveld, em que é possível observar o perfil, calcular pela curva diferença; e pelos indicadores estatísticos Rwp, χ^2 reduzido, que estão relacionados ao ajuste do perfil de difração e pelo RF_2 , que está relacionado à qualidade do ajuste da estrutura.

3.1.6 Fluorescência de raios X (FRX): A análise elemental semiquantitativa pela técnica de energia dispersiva não requer preparo das amostras. Foi utilizado para o teste o instrumento EDX-720 (Shimadzu), com colimador de 10mm, na faixa de energia Na-U. A voltagem do aparelho varia de 5 a 50kV e a corrente do tubo entre 1 e 1000 mA. O detector é um sistema de Si(Li) de semi-condutor arrefecida com Ni líquido a -196°C . O tempo para cada amostra foi de 100 s, tensão de 15 kV e 100s na faixa de energia de Ti-U com tensão de 50 kV. As medidas foram realizadas sob pressão de 30 Pa. Sob as condições iniciais que devem ser a atmosfera a vácuo e a amostra em formato de pó, as amostras foram colocadas no porta-amostras do instrumento, que já indica a quantidade de material necessária para o teste, visto que apenas a superfície do material é analisada. Este porta amostras fica sob uma película de polietileno para proteção da amostra. O resultado foi avaliado com o software XCOM, que é um código desenvolvido para fazer o cálculo do raio X e coeficientes de atenuação de raios gama e secções transversais pesando interação para elementos puros ($Z = 1-100$), o composto ou mistura a uma faixa de energia de largura (1 keV -100 GeV)²³.

3.2 EXPERIMENTO 2

Efeito do pré-tratamento dentinário com pó de dolomita na dentina decídua desmineralizada

3.2.1 Delineamento experimental

Dureza knoop, Micro Raman e FEG foram os testes utilizados para avaliar a dentina decídua nas seguintes condições: hígida/desmineralizada, tratada ou não-tratada com DMT em pó, com e sem contato com CIV. Para este experimento foram preparadas cavidades Classe I em 32 molares decíduos pré-selecionados. Os dentes foram divididos em 2 grupos (n=16) de acordo com a condição dentinária: hígido (G1), desmineralizado (G2). Subgrupos (n=8) foram formados para analisar isoladamente a ação do CIV e associado ao DMT pó. As cavidades foram divididas em duas metades, em que uma delas foi isolada com esmalte de unha na base cavitária e paredes laterais, para compor a área controle de cada grupo. Todas as cavidades foram restauradas com CIV de alta viscosidade (Ketac Molar Easymix®, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), mas somente G1DMT e G2DMT receberam o pré-tratamento com pó de DMT antes da restauração (Figura 2). Esta pesquisa foi realizada com molares decíduos humanos hígidos (n=40) provenientes do Banco de Dentes da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo parecer número 1.565.693 da Comissão de Ética em Pesquisa-UEPG (Anexo A).

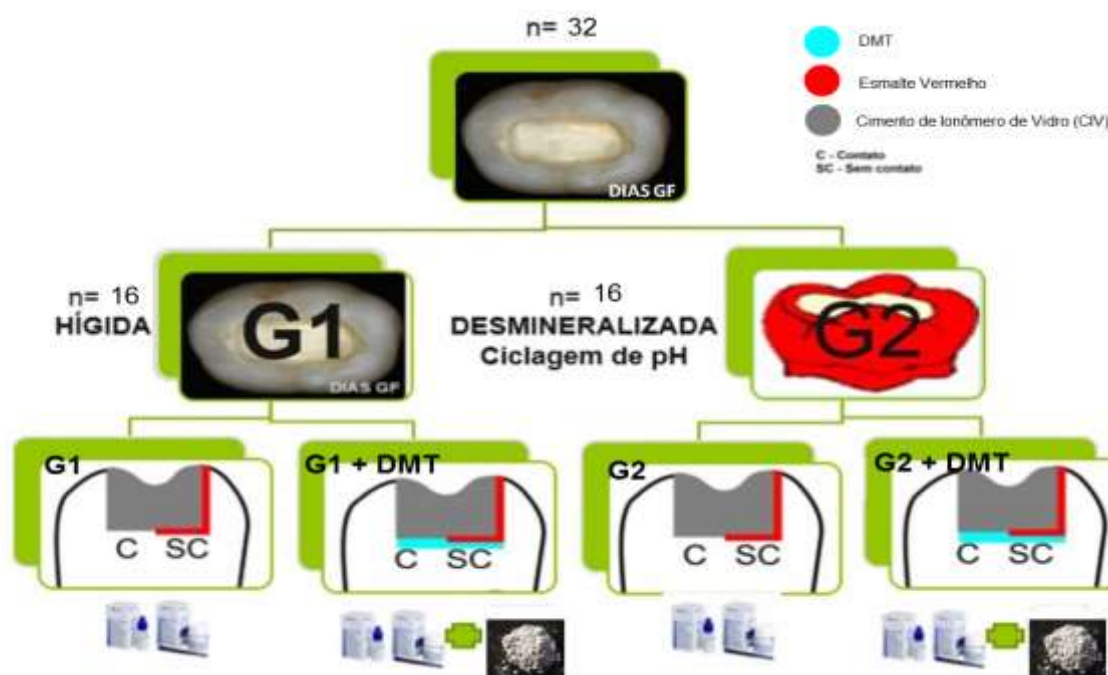


Figura 2– Corte sagital (A,B) dos dentes restaurados com CIV nas duas condições: dentina hígida (G1, G1 DMT) e desmineralizada (G2, G2 DMT). Camada de esmalte vermelho para evitar contato direto do CIV com a metade da dentina, na base cavitária e paredes laterais. Obtenção da área de contato (C) e área sem contato (SC).

3.2.2 Preparo das cavidades Classe I

A máquina de preparos cavitários (El Quip®, São Carlos, SP, Brazil) foi utilizado para o preparo das cavidades Classe I, as quais foram padronizadas nas medidas de profundidade=3mm, comprimento=6 mm e largura=4 mm. O tamanho da cavidade foi conferido com o uso do paquímetro (Digimess®, São Paulo, SP, Brazil);(Figura 3).

O preparo das cavidades foi padronizado com início no centro da superfície oclusal de cada molar decíduo. A broca de tungstênio #8 foi utilizado na profundidade inicial de 1.5 mm até alcançar a medida final de 3 mm com uma broca de alta rotação #3131, sob intensa refrigeração. Após 8 cavidades, as brocas eram repostas por novas. Para completar a etapa, todos os dentes eram imersos na cuba ultrassônica (Cristófoli Biosafety®, Campo Mourão, PR, Brazil) por 280s para remoção de debris decorrentes do preparo cavitário. O exame visual de todos os espécimes foi feito com lupa estereoscópica (10X) para verificar a existência de

exposição pulpar pelo preparo cavitário, e na presença deste, o dente era descartado. Neste estudo foram perdidos 8 dentes na etapa do preparo cavitário, devido à exposição pulpar durante a confecção das cavidades. De forma que, o estudo foi concluído com 32 dentes.



Figura 3 –Preparo das cavidades Classe I

3.2.3 Procedimentos para ciclagem de pH

Os dentes provenientes do grupo G2 ($n = 16$) foram submetidos a desmineralização dentinária para simular lesão de cárie utilizando o método de ciclagem de pH, de acordo com protocolo já utilizado¹¹. Para proteção da área externa da coroa dental foram aplicadas duas camadas de esmalte (Colorama®, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) e evitar contato com as paredes internas da cavidade.

Para estabelecer o ciclo DES-RE (desmineralização- remineralização), cada espécime foi imerso por 8h em solução desmineralizante e 16h em solução remineralizante^{20,21}. O volume das soluções desmineralizadora e remineralizadora foi de 10mL para cada dente em cada ciclo. O ciclo foi repetido por 14 dias consecutivos a temperatura ambiente sem agitação. As soluções utilizadas foram manipuladas no Laboratório Farmacêutico da UEPG. As formulações²⁰ foram as seguintes: solução desmineralizante (pH 4.8) com 2.2 mM cloreto de cálcio (CaCl_2);

2.2 mM fosfato de sódio (Na_2PO_4) e 50 mM ácido acético; solução remineralizante (pH 7.0): 1.5 mM cloreto de cálcio (CaCl_2), 0.9 mM fosfato de sódio (Na_2PO_4) e 0.15 mM cloreto de potássio (KCl).

3.2.4 Aplicação tópica da DMT em pó

A aplicação tópica da DMT em pó foi realizada somente nos grupos G1DMT e G2DMT (Figura 4). Após o condicionamento com ácido poliacrílico (condicionador ácido poliacrílico 11,5%, Nova DFL, Jacarepaguá, RJ, Brazil), foi realizado a aplicação tópica com DMT pó, sendo a quantidade padronizada com uma medida de pó dosador de CIV, e após levada à cavidade com auxílio de um porta-amálgama de plástico (Precision Maquira ®, Maringá, PR, Brazil) durante o tempo de 1 min. Antes dos procedimentos restauradores, as cavidades receberam uma camada da esmalte no lado mesial das cavidades. O desenho da pesquisa estipulou a divisão da cavidade em dois lados; SC (área controle), C (área teste). A finalidade foi para garantir que o CIV não entrasse em contato direto com a dentina, de forma que a DMT em pó fosse o único elemento em contato direto com a dentina.



Figura 4 – Aplicação da DMT em pó na cavidade classe I após procedimentos de ciclagem de pH

3.2.5 Procedimentos Restauradores

Todas as cavidades foram restauradas com CIV de vidro de alta viscosidade (Ketac Molar Easymix®, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA). As cavidades foram tratadas com ácido poliacrílico Ketac liquid (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) por 10s, lavado e seco com jato de ar por 20s e preenchidas com CIV. O CIV foi dosado na proporção de 2:2 (pó e líquido) e manipulado no bloco de espatuação com a espátula plástica (Duflex®, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). A mistura foi inserida na cavidade com auxílio da Seringa Centrix (Precision Maquira®, Maringá, PR, Brazil) seguido da técnica “pressão digital” (30s) com a fita de poliéster (K-Dent Quimidrol®, Joinville, SC, Brazil). Para o CIV foi aguardado a presa por 3min e após protegido com uma camada de vaselina (Rioquímica®, São José do Rio Preto, SP, Brasil) na superfície, de acordo com as instruções do fabricante. Após a restauração, os dentes foram armazenados em estufa por 24h a 37°C, em ambiente úmido a 100% acomodado em umidificador.

3.2.6 Preparo dos espécimes

Os dentes foram fixados na máquina de corte (Isomet® 1000 Precision Saw Buehler, Lake Bluff, IL, USA) e seccionados verticalmente no sentido mesio-distal com disco de diamante (1.3 mm Precision Saw, Lake Bluff IL®, USA) na velocidade de 300 rpm para obter fatias dentárias (n=3) de aproximadamente 1,1 mm de espessura. Duas fatias foram separadas para o teste de Dureza e a terceira fatia foi levada para o teste de FEG. Duas fatias dentárias foram posicionadas no centro de cilindros de PVC (Tigre®, Joinville, SC, Brazil) de dimensões (12x20 mm), sendo colados com fita adesiva (3M®, Sumaré, SP, Brazil) em contato direto com a placa de vidro. O cilindros foram preenchidos com resina acrílica transparente (JET®, Clear Field, SP, Brazil) pela técnica do pó e líquido. As fatias embebidas em acrílico foram levadas à máquina de polimento (Arotec®, Cotia, SP, Brazil). Uma sequência lixas de carbeto de sílcio (3M® Brazil, Sumaré, SP, Brazil) foi utilizadas sob intensa irrigação de água. O polimento final foi realizado com pasta de diamante (Arotec®,

Cotia, SP, Brasil) de granulação 1/4 µm. Para remoção dos resíduos os espécimes foram lavados em cuba ultrassônica por 12 min. Após, foram armazenados em estufa a 37°C por 24 h em um ambiente úmido a 100%, acomodado em umidificador.

3.2.7 Teste de Microdureza

A análise de microdureza foi realizada no microdurômetro (Shimadzu®, Kyoto, Japan) com uso do indentador Knoop. Por 30 s, foram aplicadas cargas de 25g para dentina hígida e 10g dentina desmineralizada²¹. As cargas foram aplicadas a 50µm (micrômetros) da base cavitária. Após, 3 medidas diferentes foram feitas com 100 µm entre cada um, na mesma profundidade no sentido horizontal. A média das 3 medidas foi considerada o valor de microdureza de cada espécime.

3.2.8 Avaliação dos íons em dentina pela microscopia eletrônica de campo (FEG)

Para avaliação em FEG foram separadas, aleatoriamente, 2 fatias dentárias de cada grupo. Os espécimes foram previamente colados em stubs metálicos com uma fina camada de cianocrilato (Pegamil bondgel ultra strong, Sao José, SC, Brazil). Após, os espécimes foram armazenados por 48h para secagem prévia à leitura no FEG. A leitura foi realizada a 50µm de profundidade da base cavitária com 5000x de magnificação. As áreas de leitura foram divididas em áreas C e SC do material restaurador com a dentina, limite imposto para presença do esmalte vermelho, aplicado na base cavitária e paredes laterais, presente na hemicavidade. No FEG foi possível obter dois tipos de análise: EDS (Espectroscopia de Energia dispersiva) e EBSD (Difração de Elétrons Retroespalhados) de caracterização química e morfológica.

3.2.9 Espectroscopia Micro-Raman

As mesmas amostras utilizadas para o teste de microdureza foram submetidas à análise de composição mineral através de Espectroscopia Raman (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha). O aparelho foi calibrado primeiro a zero e, em seguida, para os valores de coeficientes utilizando uma amostra de silicone. O teste incluiu os seguintes parâmetros: um laser de néon com 532 nm de comprimento de onda e 20 mW, uma resolução espacial de $\approx 3 \text{ mM}$, a resolução espectral de $\approx 5 \text{ cm}^{-1}$, 20 s de tempo de acumulação e 5 colegas de adições com ampliação de 20x (Olympus UK, Londres, Reino Unido) para um laser $\approx 1 \text{ mm}$ de diâmetro. As leituras foram feitas num gama espectral 300-1800 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos a partir da dentina logo abaixo da interface dente-restauração em um local aleatório com análise de mapeamento de três pontos: 0, 40 e 90 μm em profundidade (Figura 5).

A espectroscopia micro-Raman detectou o conteúdo químico da dentina através das características moleculares vibracionais de energia²². O espectro representativo de fosfato de cálcio (960 cm^{-1}), os picos de diferentes modos de vibração do grupo fosfato (591 cm^{-1} , 430 cm^{-1}), carbonato (1070 cm^{-1}), colagénio (1270 - 1453 cm^{-1}) e pico de DMT (1080 cm^{-1}) foram identificados nas amostras²².

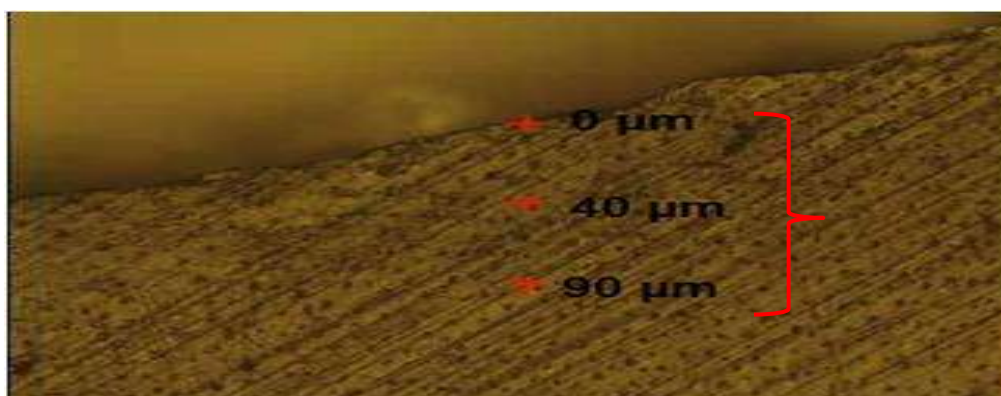


Figura 5 – Imagem digital obtida durante o mapeamento da região dentinária obtida em 3 pontos de análise (0 μm , 40 μm e 90 μm) da base cavitária. Espectroscopia de Micro-Raman.

3.3 EXPERIMENTO 3

Efeito do pré-tratamento de caseína fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e cimento de ionômero de vidro (CIV) na dentina desmineralizada de molares decíduos.

3.3.1 Delineamento experimental

Esta pesquisa foi realizada com molares decíduos humanos hígidos (n=40) provenientes do Banco de Dentes da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo parecer número 1.565.693 da Comissão de Ética em Pesquisa-UEPG. Com inspeção visual, foram selecionados segundos molares decíduos (n=40), com coroas íntegras, livres de lesões cavitadas nas superfícies oclusais ou proximais. As porções radiculares remanescentes foram seccionadas com broca esférica diamantada 1016 S em alta-rotação (Kavo do Brasil, Joinville, SC, Brasil). Os dentes selecionados foram mantidos em água destilada.

Os dentes foram divididos em 4 grupos conforme condição da dentina e tratamento realizado. Quanto à condição da dentina foram divididos em G1 (dentina hígida) e G2 (dentina desmineralizada) e nesses substratos foi verificada a ação isolada do CIV (G1 e G2) e associada com CPP-ACP (G1CPP-ACP e G2CPP-ACP).

Foram preparadas cavidades classe I em molares decíduos pré-selecionados, aplicado esmalte vermelho na metade do assoalho cavitário e paredes laterais para evitar contato do material restaurador com a porção da dentina. Foi padronizada a aplicação esmalte no lado mesial do dente em questão. Assim, no mesmo dente foram comparadas duas regiões: sem contato do CIV (SC) área controle, e em contato direto CIV e material teste (C) área teste (Figura 6).

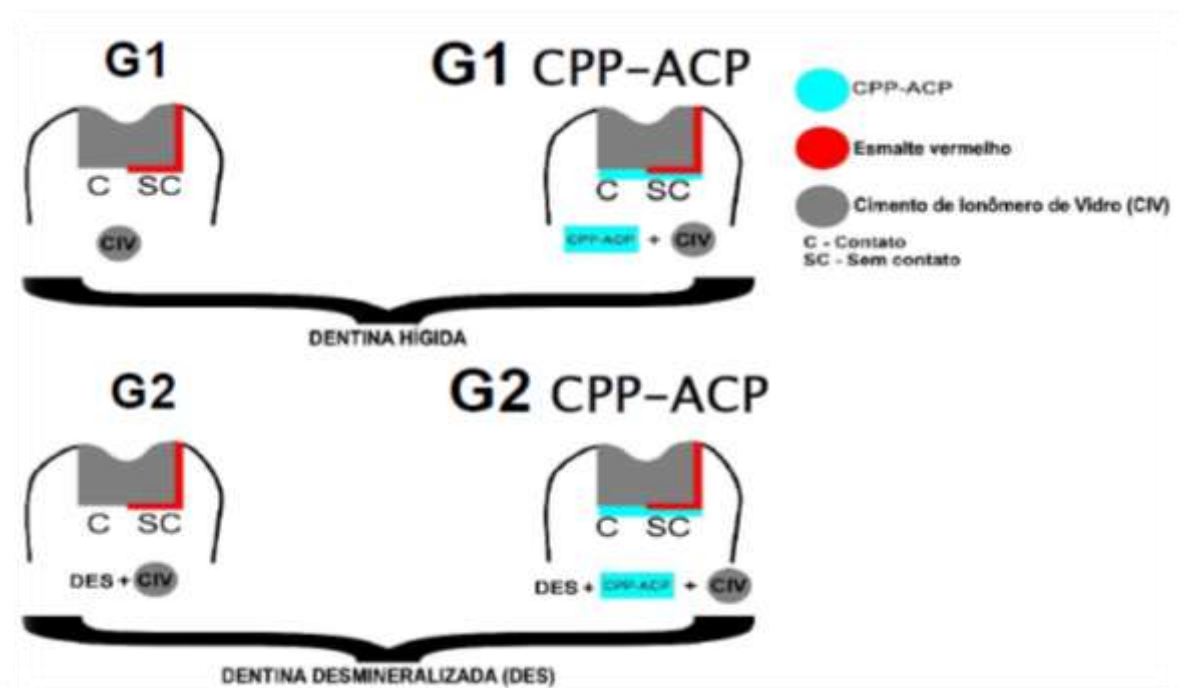


Figura 6 – Corte sagital dos dentes restaurados com CIV nas duas condições: dentina hígida e desmineralizada (G1, G2) submetidos à aplicação tópica de CPP-ACP. (G1CPP-ACP, G2CPP-ACP). Camada de esmalte vermelho para evitar contato direto do CIV com a metade da dentina.

3.3.2 Preparo Cavidades Classe I

Para evitar fratura e deslocamento dos espécimes, nos espaços entre a região de furca dos dentes, foram preenchidos com cera e as coroas fixadas com godiva (Godiva Exata DFL®, Jacarepaguá, RJ, Brasil) em uma base de madeira. Foram confeccionadas cavidades classe I com um aparelho de preparo cavitário (El Quip®, São Carlos, SP, Brasil). Os preparos cavitários foram padronizados na profundidade de 3 mm, extensão mésio-distal de 6 mm e extensão vestibulo-lingual de 4 mm, em que as medidas foram conferidas com paquímetro digital (Digimess®, São Paulo, SP, Brasil). O preparo das cavidades foi iniciado no centro da superfície oclusal de cada molar decíduo. Utilizou-se brocas de carbeto de tungstênio N°8 e ponta diamantada de alta rotação N°3131, sob refrigeração contínua. A cada 8 preparos cavitários as brocas eram substituídas por novas. Para finalizar a etapa de preparos cavitários, os dentes foram levados à cuba ultrassônica (Cristófoli Biossegurança®, Campo Mourão, PR, Brasil) por 280s para remover os resíduos provenientes do preparo cavitário.

3.3.3 Procedimento de ciclagem de pH

Após, os dentes foram divididos em dois grupos: G1 e G2. Os dentes do grupo G2 foram submetidos à desmineralização da dentina para simular lesão de cárie pelo método de ciclagem de pH¹¹. A ciclagem de pH foi realizada para desmineralizar a dentina do interior do preparo cavitário. A área externa da coroa dentária foi protegida do processo de desmineralização com a aplicação de duas camadas de esmalte de unha (Colorama[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil), evitando-se contato deste com a cavidade preparada (Figura 7).

Para estabelecer o ciclo DES-RE cada espécime foi imerso por 8h em solução desmineralizante e 16h em solução remineralizante¹¹. O volume das soluções desmineralizadora e remineralizadora foi de 10mL para cada dente, em cada ciclo. O ciclo foi repetido por 14 dias consecutivos a temperatura ambiente sem agitação. As soluções utilizadas foram manipuladas no Laboratório Farmacêutico da UEPG. As formulações foram as seguintes: solução desmineralizante (pH 4.8) com 2.2 mM cloreto de cálcio (CaCl_2); 2.2 mM fosfato de sódio (Na_2PO_4) e 50 mM ácido acético; solução remineralizante (pH 7.0): 1.5 mM cloreto de cálcio (CaCl_2), 0.9 mM fosfato de sódio (Na_2PO_4) e 0.15 mM cloreto de potássio (KCl)²⁰.

3.3.4 Aplicação tópica da Pasta Mi

Após o término dos ciclos, os dentes dos grupos G2 CPP-ACP receberam a aplicação tópica da pasta MI–CPP-ACP (Glicerol 5-10%, caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo, água pura, óxido de zinco, carboximetilcelulose de sódio, xilitol, D-sorbitol, dióxido de silicone, ácido fosfórico, dióxido de titânio, goma de guar, sacarina de sódio, etil p-hidroxibenzoato, óxido de magnésio, propilenoglicol, butil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato); (Mi Paste TM, GC, America) em quantidade padrão com auxílio de um dosador de CIV, planificado e aplicado durante um minuto com auxílio do microbrush na base cavitária (Figura 7). Previamente à aplicação da pasta, as cavidades foram condicionados com ácido poliacrílico (condicionador ácido poliacrílico 11,5%, Nova DFL, Jacarepaguá, RJ, Brasil) durante 10s e lavadas com água proveniente da seringa tríplice durante 20s. Com a finalidade de comparar duas regiões no mesmo dente, a cavidade foi dividida em

duas porções, por aplicação do esmalte (Colorama®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com microbrush (FGM®, Joinville, SC, Brasil). O qual foi aplicado na metade do assoalho cavitário e paredes laterais da porção distal no hemidente. A extensão de cobertura do esmalte de unha (Colorama®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi de 3mm no sentido méso-distal e 4 mm no sentido vestibulo-lingual. No mesmo dente, foram comparadas duas regiões: a porção mesial sem contato (SC) com CIV (sítio controle) e a porção com CIV em contato direto (C) com a dentina (área teste).

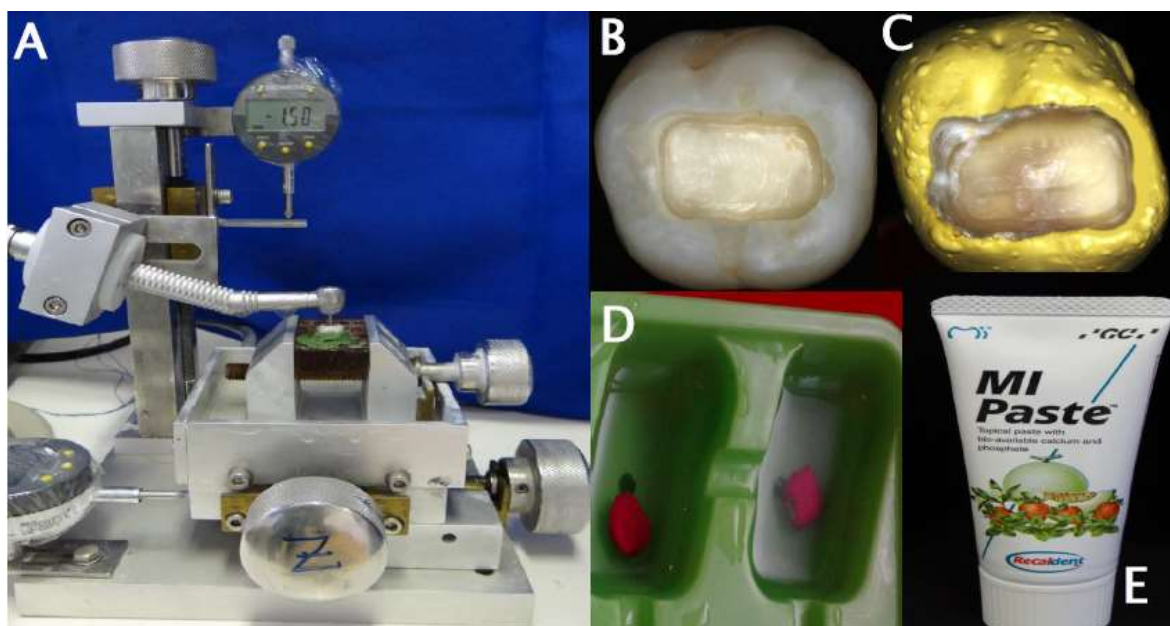


Figura 7 – A –Preparo cavidades Classe I; B- cavidade preparada; C- espécime preparado para ciclagem de pH; D- procedimento de ciclagem de pH; E – CPP-ACP Mi Paste

3.3.5 Procedimento Restaurador

Todas as cavidades foram restauradas com CIV de alta viscosidade (Ketac Molar Easymix®, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA). As cavidades foram tratadas com ácido poliacrílico Ketac líquido (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) por 10s, lavado e seco com jato de ar por 20 s e preenchidas com CIV. O CIV foi dosado na proporção de 2:2 (pó e líquido) e manipulado no bloco de espaturação com a espátula plástica (Duflex®, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). A mistura foi inserida na cavidade com auxílio da seringa centrix (Precision Maquira®, Maringa, PR, Brazil) seguido da técnica “pressão digital” (30s) com a fita de poliéster (K-Dent Quimidrol®, Joinville, SC, Brazil). Após aguardar o tempo de presa de 3 min, o CIV foi protegido com vaselina

(Rioquímica®, São José do Rio Preto, SP, Brasil) na superfície, de acordo com as instruções do fabricante. Após a restauração, os dentes foram armazenados em umidificador na estufa por 24h a 37°C .

3.3.6 Preparo dos espécimes

Os dentes foram fixados na máquina de corte (Isomet ® 1000 Precision Saw Buehler, Lake Bluff, IL, USA) e seccionados verticalmente no sentido mésio-distal com disco de diamante (1,3 mm Precision Saw, Lake Bluff IL ®, USA) na velocidade de 300 rpm para obter fatias dentárias (n=3) de aproximadamente 1.1 mm de espessura.

Duas fatias dentárias foram posicionadas no centro de cilindros de PVC (Tigre ®, Joinville, SC, Brazil), de dimensões (12x20 mm) sendo colados com fita adesiva em contato direto com a placa de vidro (3M®, SUMARE, SP, Brazil). Os cilindros foram preenchidos com resina acrílica transparente (JET ®, Clear Field, SP, Brazil) pela técnica do pó e líquido.

As fatias embebidas em acrílico foram levadas à máquina de polimento (Arotec®, Cotia, SP, Brazil). Uma sequência lixas de carbetto de sílcio (3M ® Brazil, Sumaré, SP, Brazil) foi utilizada sob intensa irrigação de água. O polimento final foi realizado com pasta de diamante (Arotec®, Cotia, SP, Brazil) de granulação 1/4 µm. Para remoção dos resíduos, os espécimes foram lavados em cuba ultrassônica por 12 min. Após, foram armazenados a 37°C por 24 h em ambiente úmido.

3.3.7 Teste de Microdureza

A análise de microdureza foi realizada no microdurômetro (Shimadzu®, Kyoto, Japan) com uso do indentador Knoop durante 30 s, em que foram aplicadas cargas de 25g para dentina hígida e 10g dentina desmineralizada²¹.

As cargas foram aplicadas a 50 μm da base cavitária. Após, 3 medidas diferentes foram feitas com 100 μm entre cada um, na mesma profundidade. A média das 3 medidas foi considerado o valor de microdureza de cada espécime.

3.3.8 Avaliação dos íons em dentina pela microscopia electrónica de campo (FEG) e espectroscopia de raios X (EDS)

Para avaliação em FEG e EDS foram separadas, aleatoriamente, 2 fatias dentárias de cada grupo. Os espécimes foram previamente colados em stubs metálicos com uma fina camada de cianocrilato (Pegamil bondgel ultra strong, Sao José, SC, Brazil) com auxílio do microbrush. Após, os espécimes foram armazenados por 48h para secagem prévia às leituras. As leituras foram realizadas a 50 μm de profundidade da base cavitária com 5000x de magnificação. As áreas de leitura foram divididas em áreas C) e SC do material restaurador com a dentina, limite imposto para presença do esmalte vermelho, presente na base cavitária e paredes laterais, na hemi cavidade. As avaliações realizadas permitiram a caracterização química e morfológica.

4. ARTIGOS

4.1 Avaliação da toxicidade e propriedades químicas da dolomita para uso na odontologia

Status: Em processo de revisão

4.2 Efeito do pré-tratamento dentinário com pó de Dolomita na dentina decídua desmineralizada

Status: Em processo de revisão

4.3 Chemical exchange between dentin pre-treatment with CPP-ACP and GIC on demineralized dentin in deciduous molars

Status: Submissão

ARTIGO 1

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E PROPRIEDADES QUÍMICAS DA DOLOMITA PARA USO NA ODONTOLOGIA

RESUMO

A dolomita (DMT) é capaz de afetar o metabolismo da mineralização por dissociação em íons cálcio e hidroxila. O objetivo deste trabalho foi analisar a toxicidade, propriedades químicas e liberação de íons cálcio e magnésio, por meio de bioensaio com *Artemia Salina*, potencial Hidrogeniônico (pH), absorção atômica, difração de raios X (DRX) e fluorescência de raios X (FRX) de 4 amostras de DMT: Bioficina® - DMT I, Flora Pinhais® - DMT II, Dolomitex® - DMT III e Gran-White – DMT IV e do hidróxido de cálcio PA (Biodinâmica® - HCa). Além disso, o estudo permitiu verificar se as amostras são adequadas para uso potencial em materiais odontológicos. As técnicas DRX e FRX, permitiram caracterizar a conformação espacial da cela unitária da *dolomita*, as fases cristalinas e elementos químicos presentes nas amostras. Foi identificado a presença de fases cristalinas além da *DMT*, como *quartzo* e *calcita*. Impurezas foram detectadas em pequenas quantidade (Fe, K, Sr, Tm, S, Cu), e o hidróxido de cálcio correspondeu às expectativas de aproximadamente 100% *portlandita*. O pH foi aferido, em diferentes concentrações de 1000 µg/mL; 750 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL e 100 µg/mL do extrato bruto diluído da amostra, inicial (0) e nos períodos de 24 e 168 horas. As amostras foram caracterizadas no padrão de alcalinidade. Na interpretação dos testes DRX e FRX, foi detectada a presença de elementos além da DMT pura, a sílica, calcita e impurezas em quantidades mínimas em 2 das amostras, enquanto o hidróxido de cálcio correspondeu às expectativas de aproximadamente 100% de portlandita. Para a determinação da toxicidade, o método alternativo da concentração letal 50 (CL50) no modelo de bioensaio com *Artemia Salina* resultou em baixo índice de toxicidade das DMTs com diferença insignificante entre os tempos 24 e 48h. Em média, ocorreu a liberação de 100ppm de íons cálcio e 32ppm de magnésio. Concluiu-se que nenhuma das amostras apresentou porcentagem significativa de outros constituintes considerados prejudiciais à saúde. De forma que, pôde-se concluir que a DMT é atóxica, pH alcalino, considerável liberação de íons cálcio, de fase cristalina que a caracteriza como potencial uso odontológico.

Palavras-chave: propriedades químicas. Toxicidade. pH.

TOXICITY ASSESSMENT AND CHEMICAL PROPERTIES OF DOLOMITE FOR USE IN DENTISTRY

ABSTRACT

Dolomite (DMT) can affect the metabolism of mineralization by dissociation of calcium ions and hydroxyl. The aim of this study was to analyze the toxicity, chemical properties and release of calcium and magnesium ions, through bioassay *Artemia Salina*, hydrogen potential (pH), atomic absorption, X-ray diffraction (XRD) and X-ray fluorescence (XRF) of 4 samples DMT: Bioficina® - DMT I, Plant Pinhais® - DMT II Dolomitex® - DMT III and Great White - DMT IV and calcium hydroxide PA (Biodinâmica® - HCA). In addition, the study showed that the samples are suitable for potential use in dental materials. XRD and XRF techniques allowed to characterize the spatial conformation of the unit cell of dolomite, crystalline phases and chemical elements present in the samples. The presence of crystalline phases was identified in addition to DMT, such as quartz and calcite. Impurities were detected in small amounts (Fe, K, Sr, Tm, S, Cu), and calcium hydroxide to expectations about 100% portlandite. The pH was measured at different concentrations of 1,000 g/mL; 750 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL and 100 µg/mL of the diluted extract of the sample, the initial (0) and the periods of 24 and 168 hours. The samples were characterized in alkalinity pattern. In the interpretation of XRD and XRF tests, the presence of elements in addition to pure DMT was detected silica, calcite and impurities in trace amounts in 2 samples, while the calcium hydroxide to expectations of approximately 100% portlandite. To determine the toxicity, the alternative method of lethal concentration 50 (CL50) in the bioassay model with *Artemia Salina* resulted in low level of toxicity of DMTs with insignificant difference between times 24 and 48 hours. On average, there was a release of 100ppm of calcium ions and 32ppm of magnesium. It was concluded that none of the samples showed a significant percentage of other constituents considered harmful to health. So that it could be concluded that DMT is non-toxic, alkaline pH, considerable release of calcium ions, the crystalline phase that is characterized as a potential dental use.

Key-words: Chemical properties. Toxicity. pH.

INTRODUÇÃO

Os minerais são nomeados conforme a localidade geográfica onde ocorrem, entretanto, a dolomita (DMT) foi nomeada pelo geólogo francês Deodat Dolomieu (1750-1801) sendo um dos primeiros estudiosos deste mineral na área dos Alpes no norte da Itália, hoje conhecida como Alpes Dolomitas¹. A DMT, conhecida como gran-white, é um cristal hexagonal composto por carbonato duplo de cálcio e magnésio ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), contém CaCO_3 (carbonato de cálcio) 54,35% e MgCO_3 (carbonato de magnésio) 45,65%, CaO (óxido de cálcio) 30,4%, MgO (óxido de magnésio) 21,9% e CO_2 (dióxido de carbono) 47,7%². A origem da DMT constitui um grande enigma geológico sendo, em geral de origem secundária, formada a partir de calcários pela substituição de parte do Ca por Mg³, o qual pode ser encontrado em lagos e cavernas de várias localidades do mundo. Da extensa revisão realizada por Müller et al. (1972)⁴ em relação à formação de carbonatos de Ca-Mg, tornou-se claro que a química aquática no momento da formação de carbonatos principalmente Mg/Ca-Mg/Ca desempenha papel importante na mineralogia dos carbonatos precipitados a partir de águas marinhas e não- marinhas.

A DMT é importante matéria prima, facilmente esmagada a um pó fino utilizada como calcário agrícola por agricultores para reduzir a acidez do solo e também para ajustar a deficiência de magnésio⁵. Além disso, pode ser utilizada em cosméticos, cremes faciais de bebê e creme dental⁶. Pode ser utilizada como suplemento de cálcio e magnésio⁷ embora sua eficácia clínica não esteja totalmente comprovada. É conhecida empiricamente por suas ações alcalinizante, antiinflamatória, analgésica, calmante, descongestionante, tonificante, relaxante e revitalizante muscular⁸. Alguns estudos realizados com a DMT, sendo alguns de toxicidade induzindo maior citotoxicidade em humanos às células AE49 do pulmão⁹; atividade antiviral em comparação com o vírus da gripe aviária H5N3¹⁰; suplemento alimentar mineral utilizado como coadjuvante na prevenção e tratamento da osteoporose, com efeito no incremento da massa óssea¹¹. Moreschi (2008)¹² investigou o efeito da DMT no processo de cicatrização de cavidades ósseas criadas cirurgicamente, sendo descrita como material de reparo por sua composição química rica em carbonato de cálcio e magnésio, constituintes da matriz óssea inorgânica o que pode sugerir hipoteticamente estimular ação

osteogênica. Concomitantemente, a suposta atividade antiinflamatória e analgésica atribuída ao mineral, poderia desempenhar um papel coadjuvante no processo de reparo ósseo. Yamamoto et al. (2010)¹³ testaram a DMT em dentifrícios para avaliar a atividade antibacteriana às bactérias gram-positivas e gram-negativas, concluiu que o composto obtido possuía funções abrasiva dentária e agente antibacteriano, capazes de contribuir para a higiene oral.

A DMT é formada por óxido de cálcio, o qual, quando em contato com a água, converte-se em hidróxido de cálcio sendo este processo responsável pelo aumento do pH por dissociação em íons cálcio e hidroxila¹⁴. A capacidade de liberação dos íons é de relevância clínica, pois está relacionado à capacidade de induzir reparação comprovada em outros materiais odontológicos tais como, MTA e hidróxido de cálcio. Outro fator de grande importância é que estudos têm revelado quantidades significativas de Magnésio (Mg) na composição da dentina, esmalte, cimento¹⁵ sendo o Mg também presente na DMT. O que pode sugerir afetar o metabolismo de mineralização, por possíveis efeitos no processo de cristalização da fase mineral inorgânica¹⁵.

Devido à composição da DMT descrita na literatura, evidenciado por alto teor de carbonato de cálcio e magnésio, o estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade e propriedades químicas para a adequação da DMT para uso na composição de materiais odontológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

As estruturas cristalinas, composição química, pH, capacidade de liberação de íons cálcio e toxicidade foram estudadas nas seguintes amostras de dolomita e de hidróxido de cálcio: Bioficina® (DMT I), Flora Pinhais® (DMT II), Dolomitex® (DMT III) e Gran-White (DMT IV) e hidróxido de cálcio PA Biodinâmica® (HCA) (Figura 1).

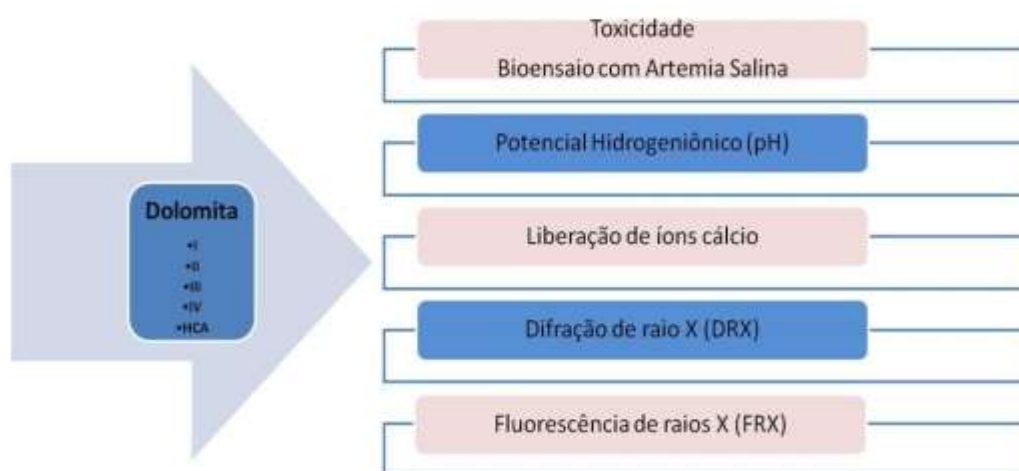


FIGURA 1- Desenho experimental

Toxicidade - Bioensaio com *Artemia Salina*: para a determinação da toxicidade, realizou-se o método alternativo da estimativa da concentração letal 50 (CL50), no modelo de *Artemia salina* baseada na técnica descrita por Meyer et al. (1982)¹⁶. Neste procedimento, coloca-se 100 mg de ovos de *Artemia* em água salinizada na proporção de 38g de sal marinho por litro; a temperatura foi mantida entre 28 a 30 °C; pH entre 8 e 9 e iluminação artificial. O estado de saturação de oxigênio foi conseguido com auxílio de uma bomba de oxigenação. Após 48 h, as larvas atingiram o estágio de metanúplio do microcrustáceo, que é mais sensível ao tratamento. As larvas não foram alimentadas. O bioensaio com *Artemia salina* consiste em distribuir 10 larvas (n = 10) em cada tubo ensaio com 5 mL da solução salina nas concentrações graduais de 25 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL, 150 ug/mL, 250 ug/mL, 500 ug/mL, 750 ug/mL e 1000 ug/mL de cada amostra. As larvas de *Artemia salina* foram incubadas, nas diversas concentrações do extrato bruto

dissolvido, durante 24h sob iluminação artificial e temperatura controlada para eclodirem. Posteriormente, foram transferidas 10 larvas para tubos de ensaio contendo solução salina (controle negativo), dicromato de potássio 0,1% (controle positivo) e a dolomita nas diferentes concentrações. O resultado foi obtido contando-se após 24 e 48 h o número de metanúplios do microcrustáceo mortos e vivos em cada tubo de ensaio, por meio de visualização macroscópica com lupa e a análise estatística descritiva que foi feita com a contagem do número de sobreviventes calculando-se a porcentagem de mortos. Os microcrustáceos foram considerados mortos quando não exibiam nenhum movimento após 10 segundos de observação¹⁶. Para o cálculo da toxicidade, foi determinada a CL₅₀, a concentração de agente tóxico que causa a mortalidade de 50% dos organismos expostos no período de 24 ou 48 h. A estimativa realizada foi pela Análise de Regressão de Probit, o qual é apropriado para conjuntos de dados em que a variável dependente é medida em unidades do tipo Sim ou Não, neste caso a resposta é representada pela porcentagem de sobreviventes, nascidos, etc. O teste foi realizado em duplicata.

Análise do potencial Hidrogeniônico (pH): A análise foi realizada ao dispersar as amostras comerciais de dolomita e hidróxido de cálcio em 1 mL de água destilada. Foram estudadas cinco concentrações distintas para cada amostra: 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL e 1000 µg/mL. Inicialmente, mediu-se o pH da água destilada. Em seguida, os valores de pH das dispersões preparadas foram aferidas após o contato com o eletrodo de análise (pH_{INICIAL}, 0 h) e nos períodos 24 h e 168 h. Nestes períodos, as amostras foram armazenadas em estufa à 37°C¹⁷. Para análise do pH foi utilizada a análise Anova 1 fator com pós teste de Tukey. Adotou-se um nível de significância $p < 5\%$, utilizou-se o *software* GraphPad Prism 5.0.

Liberção de íons cálcio e magnésio: foi utilizado o método oficial de absorção atômica, que se fundamenta na solubilização das fontes de cálcio que estão presentes na amostra com ácido concentrado, para após determinar a concentração do elemento Ca por meio deste método. Primeiramente, foi transferido 0,500g de cada DMT para béqueres de 100mL. Após, adicionado 20mL de ácido clorídrico 1+1 e fervido por 10 minutos, então transferido para balões

volumétricos de 100ml e completado o volume com água destilada. Foi utilizado uma alíquota do extrato das DMTs e transferidas para balões de 50mL. Foi adicionado 5ml de óxido de lantânio a 5% e completado o volume com água. O lantânio foi adicionado por sua capacidade de eliminar as interferências de outros íons. Após a confecção da amostra, o espectrômetro de absorção atômica com chama foi colocado nas condições exigidas para a determinação do cálcio conforme o manual de operação. O aparelho foi calibrado e a leitura imediata foi realizada. O bulk é o padrão que se usa para fazer a curva do equipamento, para que tenhamos uma referência de valor de Ca e Mg, sendo 10,25ppm e 2,04 ppm, respectivamente. Os valores foram anotados em uma planilha de Excel.

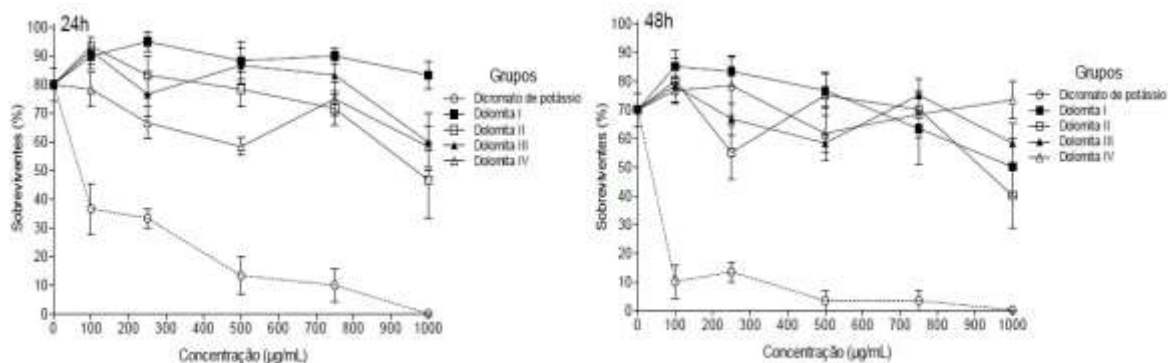
Caracterização estrutural: A estrutura cristalina das amostras de DMT e HCa comerciais foram analisadas por meio de difração de raios X (DRX). Os dados foram coletados em um difratômetro Shimadzu XRD 6000, operando com tubo de cobre a 40 kV e 30 mA. Foram utilizadas fendas de divergência e espalhamento iguais a 1° e fenda de recepção igual a 0,15 mm. A radiação $k\beta$ foi eliminada por uso de monocromador de grafite. A varredura foi realizada no alcance de 3° a 120° em modo de varredura contínua, na razão de $1,0^\circ$ /min. As fases cristalinas foram identificadas ao comparar o padrão de difração observado com os padrões presentes nos arquivos de informação cristalográfica (*crystallographic information file – cif*), disponíveis no Banco de Dados de Estruturas Cristalinas Inorgânicas (*Inorganic Crystal Structure Database - ICSD*)^{18,19}. Neste trabalho foram utilizados os modelos estruturais das fichas ICSD #10404 para a dolomita (carbonato de cálcio e magnésio, $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), ICSD #1011159 para o *quartzo* (dióxido de silício, SiO_2), ICSD #18166 para a *calcita* (carbonato de cálcio, CaCO_3) e ICSD #1001768 para a *portlandita* ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Utilizou-se a função de perfil pseudo-Voigt de Thompson-Cox-Hastings²⁰ para o ajuste dos picos de difração. O modelo fenomenológico de Peter Stephens (1999)²¹, incorporado à função de perfil, permitiu o ajuste do alargamento anisotrópico dos picos de difração. Para a análise quantitativa de fases foi adotado o modelo de Howard e Hill (1987)²². A qualidade dos refinamentos foi monitorada por análise visual do gráfico de Rietveld, em que é possível observar o perfil, o calculado e a curva diferença entre os dois; e pelos indicadores estatísticos Rwp (Índice do perfil de Rietveld), χ^2 (Qui-quadrado) reduzido, que estão relacionados ao ajuste do perfil de difração e pelo RF2 e à

qualidade do ajuste da estrutura cristalina (posições atômicas, parâmetros da cela unitária, parâmetros de deslocamento atômico e fator ocupação).

Fluorescência de raios X (FRX): Foi utilizado para o teste o espectrofotômetro de fluorescência de raios X por dispersão de energia Shimadzu EDX-720, com colimador de 10mm, na faixa de energia Na-U. A voltagem do aparelho varia de 5 a 50kV, e a corrente do tubo entre 1 e 1000 mA. O detector é um sistema de Si (Li) de semi-condutor arrefecida com N líquido a -196°C . O tempo para cada amostra foi de 100s, tensão de 15 kV e 100s na faixa de energia de Ti-U com tensão de 50 kV. As medidas foram realizadas sob pressão de 30 Pa. Sob as condições iniciais que devem ser a atmosfera a vácuo e a amostra em formato de pó, as amostras foram colocadas no porta amostras do instrumento, que já indica a quantidade de material necessária para o teste, visto que apenas a superfície do material é analisada. Este porta amostras fica sob uma película de polietileno para proteção da amostra. O resultado foi avaliado com o software XCOM, que é um código desenvolvido para fazer o cálculo de raios X, coeficientes de atenuação de raios gama e secções transversais pesando interação para elementos puros ($Z = 1-100$), o composto a uma faixa de energia de largura (1 keV -100 GeV)²³.

RESULTADOS

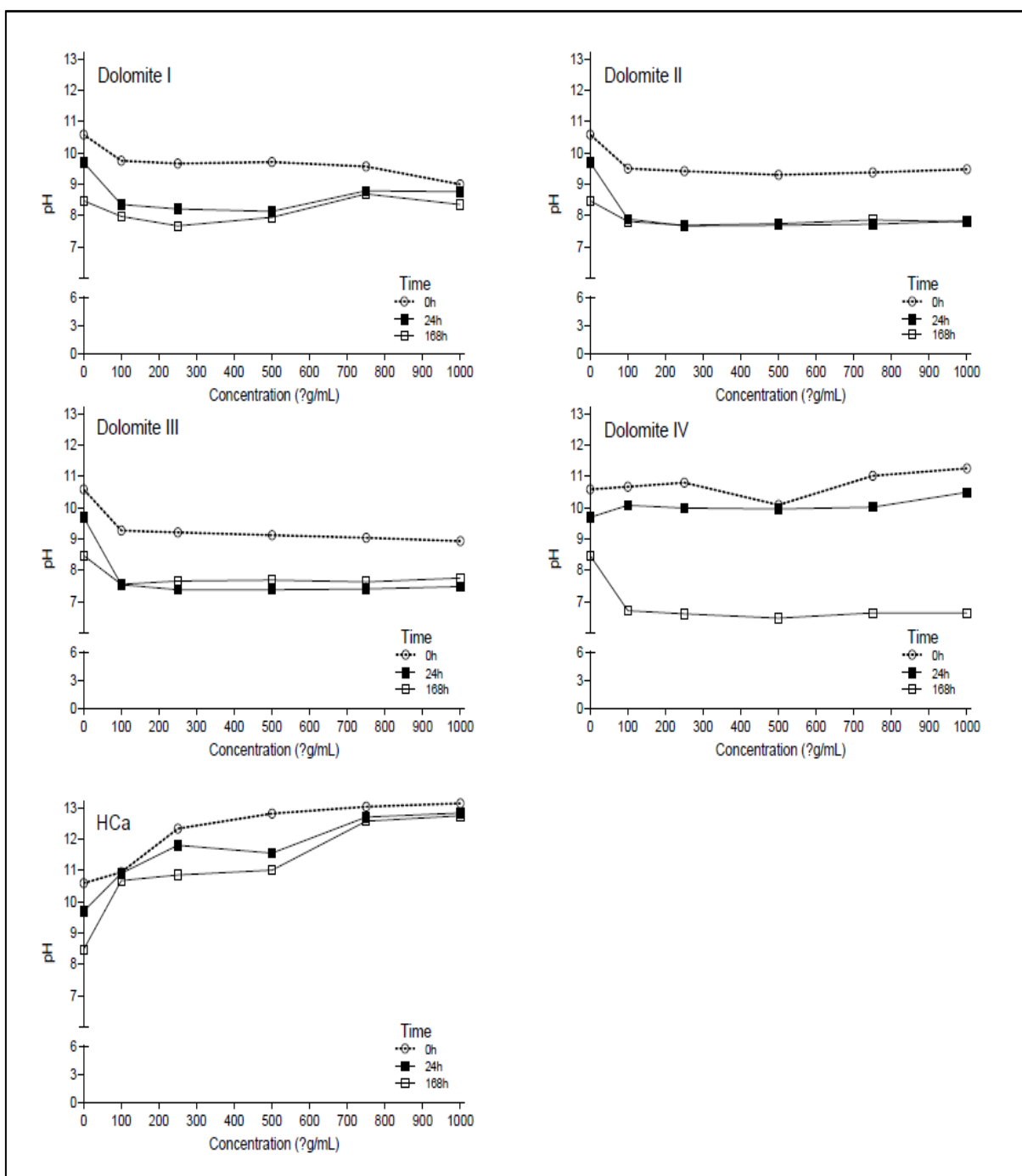
Teste de toxicidade: As 4 amostras comerciais de DMT não foram consideradas tóxicas. Após 24 h, como podemos observar na Figura 2, o controle positivo, que no caso é o dicromato de potássio, apresentou valores distantes da DMTs estudadas, com toxicidade alta de 38, 12 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a de menor valor dentre elas foi a dolomita II com 1243,80 $\mu\text{g/mL}$. A análise de 48 h não apresentou diferenças significativas. Podemos observar o Erro-padrão em cada uma das concentrações, tanto nas avaliações de 24 horas como nas de 48 horas. Segundo Meyer et al. (1982)¹⁶ que estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL50, apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, desde então, considera-se que quando são verificados valores acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$, estes, são considerados atóxicos. Sendo assim, elas não podem ser classificadas como tóxicas, portanto, não apresentando danos ao organismo.



*Concentração Letal 50 (CL50) determinada em cada período de avaliação com a análise de regressão Probit - Método Finney (Distribuição log-normal). 24h: Dicromato de potássio (controle positivo): CL50 = 38,12µg/mL; Dolomita I: CL50 = 3438,48 x106 µg/mL; Dolomita II: CL50 = 1243,80µg/mL; Dolomita III: CL50 = 2727,42µg/mL; Dolomita IV: CL50 = 24,34 x106 µg/mL. 48h: Dicromato de potássio (controle positivo): CL50 = 1,52µg/mL; Dolomita I: CL50 = 1544,55 µg/mL; Dolomita II: CL50 = 1710,90µg/mL ; Dolomita III: CL50 = 9762,32 µg/mL; Dolomita IV: CL50 = 1,57 x106 µg/mL

FIGURA 2 - Curvas dose-resposta da sobrevivência (%) de *Artemia sp* às diferentes formulações de Dolomita após 24h e 48h*.

Análise do potencial Hidrogeniônico (pH): A figura 3 ilustra os valores de pH obtidos para as amostras estudadas nas distintas concentrações. Em todos os casos, os valores pH das dispersões estão associadas a meios básicos. Neste sentido, para as amostras DMT I, DMT II e DMT III o pH ficou entre aproximadamente 8 e 10, não sendo observadas diferenças significativas entre as concentrações estudadas. Para a amostra DMT IV houve um aumento para pH no tempo 0 h e uma queda no pH para valores próximos a 7 em 168 h, porém não estatisticamente significativa. Os maiores valores de pH foram observados para a amostra HCa (principalmente nas concentrações I, II e III) com valores próximos a 12. As maiores concentrações de hidróxido de cálcio (concentrações I, II e III) foram estatisticamente diferente do pH da água destilada e de todas as diferentes concentrações das quatro dolomitas nos três diferentes tempos. Não havendo diferença entre as dolomitas e entre suas concentrações. Nas concentrações da dolomita IV houve uma queda do pH do tempo inicial de 0 h para o tempo final de 168 h, porém não estatisticamente significativa. Mantendo-se com pH básico.



*AD: água destilada. Concentração I: 1000 µg/mL; Concentração II: 750 µg/mL; Concentração III: 500 µg/mL; Concentração IV: 250 µg/mL; Concentração V: 100 µg/mL. Anova one-way com pós teste Tukey. *H. de cálcio nas concentrações I, II e III diferentes de todos os outros grupos.

FIGURA 3 - Análise do pH em diferentes tempos e diferentes concentrações de Dolomita e Hidróxido de cálcio*.

Liberação de íons cálcio e magnésio: as DMT analisadas apresentaram grande liberação de íons cálcio, destacando-se a DMT III com um valor de

147,70 ppm, após a DMT IV com 99,43 ppm, DMT II com 83,17ppm e a DMT I com 81,18 ppm, respectivamente. A liberação de magnésio foi mais moderada, com o maior valor na DMT I com 50,98 ppm (Figura 4).

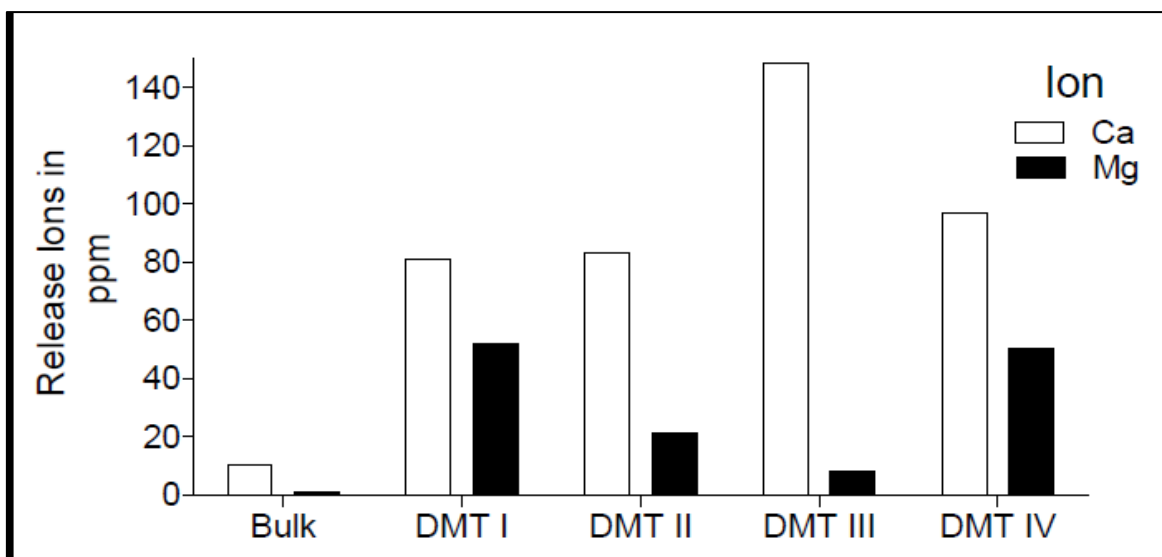


FIGURA 4 - Análise da liberação de íons cálcio e magnésio pelo método de absorção atômica

Análise estrutura por DRX e refinamento Rietveld: a partir da análise de difração por raios X, pode ser observada a estrutura química da Dolomita. A Figura 6 ilustra os gráficos obtidos pelo método de refinamento Rietveld para as amostras de DMT e HCa comerciais. Pode-se observar uma significativa convergência entre os dados obtidos experimentalmente e calculados, o que demonstra a boa qualidade dos ajustes. Os indicadores de qualidade do refinamento presentes na também mostram a boa qualidade das análises de Rietveld. A identificação de fases revela que as amostras DMT I e DMT II possuem como fase majoritária o mineral *dolomita* (ICSD #10404), porém também se observou a presença de certa quantidade de *quartzo* (ICSD #1011159) em suas composições. Por outro lado, a amostra DMT III apresentou como fase majoritária a *calcita* (ICSD #18166) sendo que, neste caso, a fase *dolomita* está presente como fase secundária juntamente com o *quartzo*. A amostra DMT IV também apresentou estas três fases cristalinas, assim como na amostra DMT III. Entretanto, a fase *dolomita* é a majoritária na DMT IV. A amostra I e II apresentaram em sua composição dolomita (carbonato de cálcio e magnésio –

$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) e sílica (dióxido de silício - SiO_2), enquanto as amostras III e IV apresentaram além disso a fase calcita (carbonato de cálcio – CaCO_3). O HCa, correspondeu à presença de apenas portlandita (hidróxido de cálcio – $\text{Ca}(\text{OH})_2$)

A tabela 1 fornece o percentual em massa dos produtos em estudo, em relação à presença de DMT pura, Quartzo e Carbonato de Cálcio obtidas no DRX.

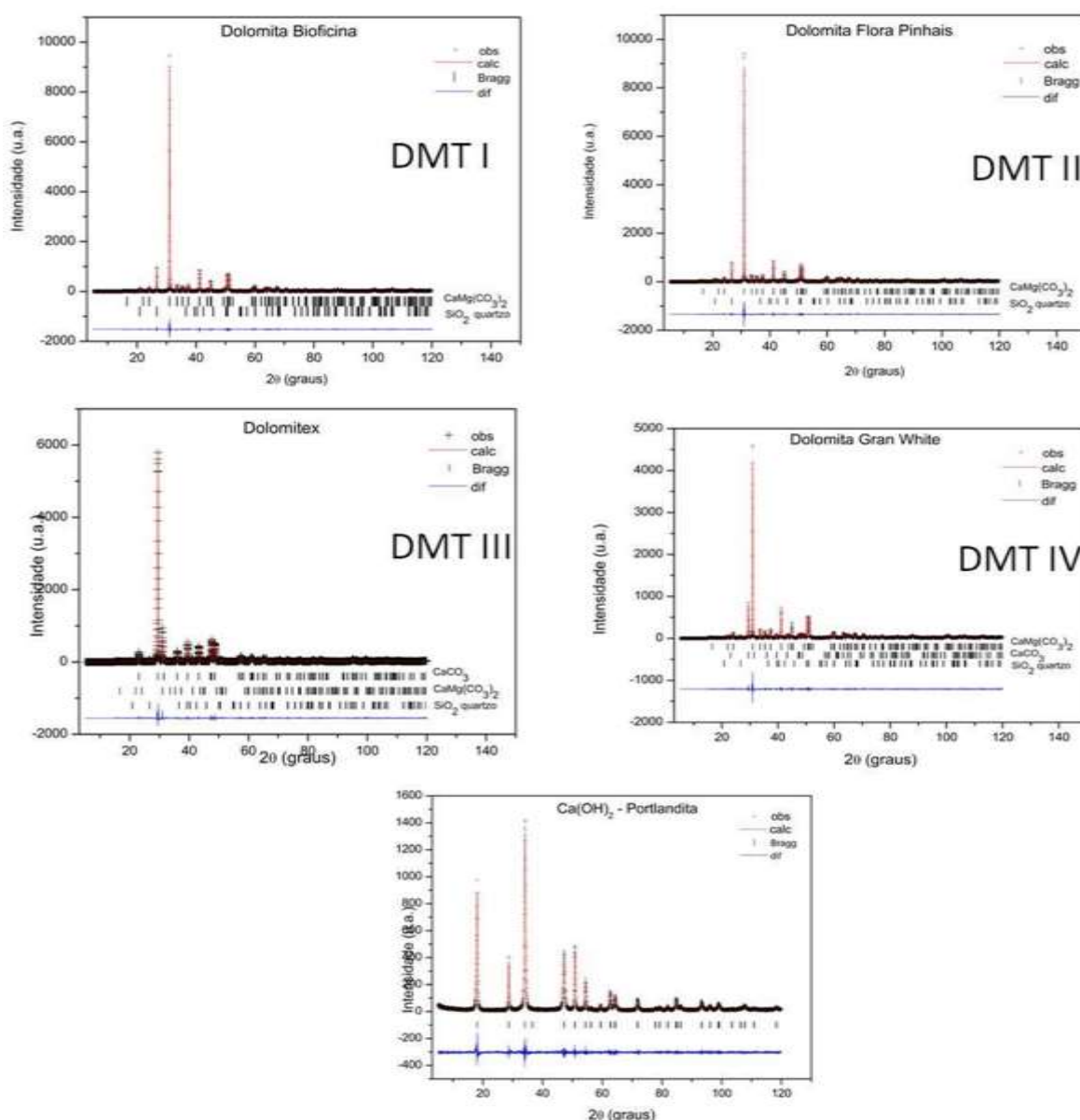


FIGURA 5 – Gráficos de Rietveld para amostras comerciais de DMT e HCa

TABELA 1 – Porcentagem em massa das amostras de DMT utilizadas no estudo obtidas por DRX

	Porcentagem em Massa (%)		
	Dolomita pura	Quartzo	Carbonato de Cálcio
DMT I	88%	12%	-
DMT II	89%	11%	-
DMT III	26%	1,7%	72%
DMT IV	85%	2%	13%

Composição química por FRX: A Tabela 2 mostra os resultados obtidos pela análise de FRX. Em todos os casos, pôde-se observar que o Ca é o elemento mais abundante das amostras estudadas, com certa variação em suas quantidades (entre 62,79% e 98,97%). Além disso, importantes diferenças foram identificadas quanto à presença de outros elementos e a proporção dos mesmos. As amostras DMT I, DMT II e DMT IV apresentam em suas composições significantes quantidades de Mg (28,91%, 29,35%, 26,05%, respectivamente), fato que poderia estar associado à presença da fase majoritária de *dolomita*. A não observação deste elemento na amostra DMT III e a alta concentração de Ca (97,70%) estariam associados à fase majoritária de *calcita*. O elemento Si está presente em todas as amostras comerciais de *dolomita*, que poderia ser associado à presença de *quartzo* nas amostras. Entretanto, o mesmo está presente em uma quantidade inferior na amostra DMT III (1,84%) e DMT IV (1,66%) em relação às amostras DMT I (7,16%) e DMT II (9,98%). Estes resultados corroboram com os observados na análise estrutural por DRX. Somando-se às impurezas comumente encontradas em derivados de minerais, foram identificadas em todas as amostras, principalmente na DMT IV (Gran-White) mas nenhuma destas impurezas (Fe, K, Sr, Tm, S, Cu) foi presente em quantidades significativas.

TABELA 2 – Análise composicional por FRX*.

Amostras	Dolomita Bioficina®	Dolomita Flora Pinhais®	Dolomitex®	Gran White	Hidróxido de cálcio P.A Biodinâmica®
	DMT I	DMT II	DMT III	DMT IV	HCa
Elementos	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Ca	63,08	62,79	97,70	71,32	98,9
Mg	28,91	29,35	-	26,05	-
Si	7,16	9,98	1,84	1,66	-
S	0,56	0,58	0,40	0,49	0,35
Fe	0,25	0,25	-	0,17	0,09
Sr	0,011	0,02	0,47	0,03	0,36
Tm	-	0,01	-	0,01	-
K	-	-	-	0,24	0,18
Cu	-	-	-	-	0,01
Co	-	-	-	-	0,008

*(Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; S = Enxofre; Si = Silício; Fe = Ferro; Sr = Estrôncio; Tm = Túlio; K = Potássio; Cu = Cobre; Co = Cobalto).

DISCUSSÃO

A análise de DRX identifica, confirma e fornece percentual em massa dos componentes do material. Nesta metodologia, foi possível identificar a presença de DMT pura e materiais associados (carbonato de cálcio e quartzo) presentes nas DMTs. A presença predominante da DMT foi identificada na maioria das amostras (DMT I, DMT II e DMT IV). A DMT III apresentou um alto percentual de carbonato de cálcio (72%), sendo o valor de 26% de DMT pura. O método DRX e

refinamento Rietveld permitiu a precisa identificação das fases cristalinas e percentual em massa, que constituem as amostras comerciais analisadas. O resultado foi corroborado pelas análises de FRX e absorção atômica.

As fases cristalinas são as formas como os átomos, moléculas e íons se organizam dentro de um material de maneira fixa, regular e repetitiva³⁵. Sendo estas responsáveis pela estabilidade e densidade do material^{34,35}. As amostras comerciais em análise apresentaram as fases cristalinas: DMT, calcita e sílica. A presença predominante da fase DMT foi identificada em todas as amostras avaliadas. Devido à composição da DMT, rica em carbonato de cálcio e magnésio, sendo estes elementos minerais importantes na constituição óssea inorgânica, a qual passa a ser o alvo de outras áreas de pesquisa devido à ação estimulante osteogênica, de atividade antiinflamatória e analgésica³⁵.

Entretanto, as amostras II e III de DMT apresentaram a fase calcita constituída de carbonato de cálcio. Sendo que, este pertencente ao grupo dos carbonatos, sais inorgânicos, composição química do íon carbonato $(\text{CO}_3)^{2-}$, anidros, os quais se cristalizam no sistema romboédrico³⁶. Em muitos casos, a cristalização de carbonatos a partir de soluções ricas em Ca e Mg tende a não formar calcita, e sim, cristais estratificados constituídos de camadas de íons carbonato alternado com camada de íons Mg e DMT.

A DMT é composta por óxido de cálcio, que em contato com o meio líquido converte-se em hidróxido de cálcio, conferindo uma maior alcalinidade em função da reação do óxido com a água²⁴. O cálcio é de grande importância na Odontologia por sua capacidade mineralizadora, presente em barreiras de tecido mineralizado, proteções pulpares, pulpotomias e selamentos biológicos apicais^{24,25,26}. O íon Ca tem a capacidade de ativar a ATPase cálcio- dependente presente em áreas a serem mineralizadas²⁷.

A aferição do pH e liberação de cálcio da DMT teve por objetivo confirmar a capacidade antimicrobiana e mineralizadora. Por meio desta, ao se utilizar o espectômetro de absorção atômica pôde-se observar a grande liberação de íons cálcio das amostras. Todas amostras em estudo apresentaram alto valor, em destaque a DMT III, seguida da IV, II e I, respectivamente. Segundo Stuart et al. (2006)²⁶ o pH alcalino promove a eliminação de bactérias, como o *Enterococcus faecalis*, que podem sobreviver após o preparo químico-cirúrgico e capaz de induzir ou manter a inflamação. Quando o pH encontra-se próximo a 11, os

microorganismos apresentam maior dificuldade em sobreviver^{28,29}. Outro fator importante do pH alcalino, está na correlação entre a estimulação do processo de reparo tecidual pela deposição de tecido mineralizado resultante da liberação de íons cálcio^{24,30}.

O estudo evidenciou a ausência de toxicidade nas amostras. Na primeira avaliação a DMT I aparece com o maior valor, de $3438,48 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$, seguida da IV ($24,34 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$), III ($2727,42 \mu\text{g/mL}$) e II ($1243,8042 \mu\text{g/mL}$), respectivamente. Ao se avaliar os efeitos toxicológicos para o uso potencial de aplicação da DMT na odontologia, a partir da metodologia da toxicidade pode-se caracterizar o grau de virulência de substância nociva para o organismo ao todo ou parte dele³¹, e evidenciar os efeitos nocivos à saúde. A toxicidade pode ser avaliada por diferentes métodos, como contagem de células, determinação de taxas de proliferação, a síntese de diferentes produtos celulares ou determinação de atividades enzimáticas³¹. Neste método valores acima de $1000 \mu\text{g/mL}$ são considerados atóxicos. A utilização do bioensaio com *artemias salina*, considerado indicador da presença de substâncias tóxicas, é de fácil manuseio em laboratório, de resposta rápida e resultados confiáveis^{32,33}. Além de que, o ensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina* é frequentemente empregado para avaliar compostos utilizados na farmacologia³⁴. Neste método valores acima de $1000 \mu\text{g/mL}$ indicam atoxicidade.

Na análise FRX, impurezas comumente encontradas em derivados de minerais foram identificadas nas amostras, principalmente na amostra IV correspondente à Gran-white, no entanto nenhum dos elementos encontrados além daqueles identificados na análise DRX (Fe, K, Sr, Tm, S, Cu e Co) mostrou quantidades significativas tóxicas. Em estudos sobre o MTA (agregado trióxido mineral), biomaterial cerâmico de ampla utilização na Odontologia, observou-se que os íons Ca quando em contato com o tecido conjuntivo determinam área de necrose ao formar dióxido de carbono. Este, junto ao hidróxido de cálcio formam cristais de calcita (carbonato de cálcio) que servem de núcleos de calcificação³⁷. A alcalinidade do meio estimula o tecido conjuntivo a secretar a glicoproteína fibronectina, que aliada aos cristais de calcita estimulam a formação de colágeno tipo I associado ao cálcio induz a mineralização³⁷.

A medicina natural utiliza recursos da natureza para o tratamento das mais diversas patologias, entretanto, os estudos embasados cientificamente devem

corroborar para alcançar resultados potenciais de uso farmacológico dos materiais. O estudo de toxicidade e propriedades físico-químicas do calcário dolomítico brasileiro é o primeiro passo para propor uma fórmula farmacêutica. A qual pode ser direcionada para o tratamento endodôntico de dentes decíduos, ou ainda, para contribuir na remineralização da dentina.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a DMT é atóxica, capaz de liberar quantidade considerável de cálcio e com pH alcalino. Apresenta composição química favorável ao emprego na Odontologia, sendo identificados na sua composição elementos relacionados ao processo de remineralização comuns em materiais odontológicos, além de porcentagem não-significativas de impurezas. Desta forma, mais estudos poderão ser feitos para analisar a possibilidade de utilização da DMT como constituinte de material odontológico.

REFERÊNCIAS

1. Janez s. Žiga zois in déodat de dolomieu. Kronika: časopis za slovensko krajevno zgodovino [the chronicle: the newspaper for the slovenian history of places] (in slovene, with an english abstract) (association of slovenian historical societies, section for the history of places), 2001; 49: 65–72.
2. Berlo, d. V. et al. Investigation of the cytotoxic and proinflammatory effects of cement dusts in rat alveolar macrophages. *chem res toxicol* 2009;22:1548-58.
3. Klein C, Dutrow B. Manual de ciência dos materiais. 23.ed. Porto alegre: bookman, p. 442, 2012.
4. Müller G, Irion G, Fornstner U. Formation and diagenesis of inorganic ca-mg carbonates in the lacustrine environment. *Naturwissenschaften, Heidelberg* 1972; 59: 158-164.
5. Chen GC et al. Leaching potential of heavy metals (cd, ni, pb, cu and zn) from acidic sandy soil amended with dolomite phosphate rock (dpr) fertilizers. *J trace elem med biol* 2006; 20:127–133.
6. Slomsk G, Odle T. Dolomite. *Gale encyclopedia of alternative medicine*. 2005. Disponível em: <<http://www.encyclopedia.com/doc/1q2-3435100269.html>> acessado em 20 de set 2015.
7. Mizoguchi T, Nagasawa S, Takahashi N, Yagasaki H, Ito M. Dolomite supplementation improves bone metabolism through modulation of calcium-

regulating hormone secretion in ovariectomized rats. *J bone miner metab* 2005; 23:140–146.

8. Stark K, Meier W. Prevenções e cura com pedras: a mais pura energia. 2. Ed. Rio de janeiro: robafim, 2002.

9. Patil G et al. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic responses of micro- and nano-particles of dolomite on human lung epithelial cells a(549). *Environ toxicol pharmacol* 2012; 2 (34):436-45.

10. Motoike K et al. Antiviral activities of heated dolomite powder. *Biocontrol sci* 2008; 13 (4):131-8.

11. Cordeiro APB, Moreira LMA. Proliferação celular e quebras cromossômicas em células submetidas à ação da dolomita brasileira (gran-white) in vitro. *Rev ciênc méd boil* 2004;3(2): 181-187.

12. Moreschi E. Efeito da dolomita no reparo de cavidades ósseas em ratos: análise radiográfica e histológica. 27 f. Dissertação (mestrado) - curso de farmácia, Universidade Estadual de Maringá, maringá, 2008.

13. Yamamoto, O, Ohira T, Alvarez K, Fukuda M. Antibacterial characteristics of CaCo₃–MgO composites. *Materials science and engineering* 2010;173 (1-3):208-212.

14. Duarte MAH et al. Ph and Calcium ion release of 2 root-endo filling materials. *Oral surg oral med pathol oral radio endod*, 2003; 95(3): 343-347.

15. Legeros RZ, Kijkowska R, Bautista C. Legeros JP. Synergistic effects of magnesium and carbonate on properties of biological and synthetic apatites. *Connect tissue* 1995; 33(1-3): 203-209.

16. Meyer BN et al. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta med* 1982;45:31-34.

17. Aguilar FG. Estudo da biocompatibilidade do cimento de aluminato de cálcio para uso odontológico, avaliação do ph, liberação de íons cálcio e atividade antimicrobiana. 2012. 130 f. Tese (doutorado) - curso de odontologia, universidade de são paulo, ribeirão preto, 2012.

18. Toby B, Expgui H. A graphical user interface for gsas. *Journal of applied crystallography* 2001; 34(2):210-213.

19. Larson AC, Von Dreele R, Gsas B. General structure analysis system. *Lance* 1994.

20. Thompson P, Cox D, Hastings J. Rietveld refinement of debye-scherrer synchrotron x-ray data from al₂o₃. *Journal of applied crystallography* 1987; 20 (2): 79-83.

21. Peter S, Janez S. Žiga zois in déodat de dolomieu. *Kronika: časopis za slovensko krajevno zgodovino* [the chronicle: the newspaper for the slovenian history of places] (in slovene, with an english abstract) (association of slovenian historical societies, section for the history of places) 2001; 49:65-72.

22. Hil R, Howard C. Quantitative phase analysis from neutron powder diffraction data using the rietveld method. *Journal of applied crystallography* 1987; 20(6):467-474.
23. Pires LF, Prandel LV, Saab, SC. The effect of wetting and drying cycles on soil chemical composition and their impact on bulk density evaluation: an analysis by using xcom data and gamma-ray computed tomography. *Geoderma* 2014:512-520.
24. Holland R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. *Rev bras pesq méd biol* 1971; 4(2):83-95.
25. Silva PG et al. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic responses of micro- and nano-particles of dolomite on human lung epithelial cells a(549). *Environ toxicol pharmacol* 2012; 34(2): 436-45.
26. Leonardo MR et al. Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas submitted to two different methods of root canal treatment. *J Endod* 1995;21(3):137-141.
27. Tronstad L et al. Ph changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981; 7: 17-21.
28. Stuart CH et al. Enterococcus faecalis: it's role in root canal treatment failure and current concepts ins retreatment. *J Endod* 2006.32:93-98.
29. Mchugh CP, Zhang P, Eleazer PD. Ph required to kill enterococcus faecalis in vitro. *J Endod* 2004;30: 218-219.
30. Okabe T, Sakamoto M, Matsushima K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. *J Endod* 2006;32:198-201.
31. Schwalz PG. Et al. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic responses of micro- and nano-particles of dolomite on human lung epithelial cells a(549). *Environ toxicol pharmacol* 2012;34(2):436-45.
32. Guerra R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere* 2001; 44:1737-1747.
33. Bizukojc EL, Miksch K, Jutsz MA, Kalka J. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. *Chemosphere* 2005; 58:1249-1253.
34. Toby B, ExpGUI H. A graphical user interface for gsas. *Journal of applied crystallography* 2001; 34(2): 210-213.
35. Moreschi E. Efeito da dolomita no reparo de cavidades ósseas em ratos: análise radiográfica e histológica. 27 f. Dissertação (mestrado) - curso de farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
36. Lameu EL et al. Análise e caracterização de calcitas por difração de raios x. In anais do XVIII Eaic, Ponta Grossa, 2009.
37. Sinhoreti MAC, Vitti RP, Correr-Sobrinho L. Biomateriais na odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. *Rev assoc paul cir dent* 2013;67(3): 178-86.

38. Peixoto EMA. Silício. Química nova escola 2001; 14. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc14/v14a12.pdf>>. Acesso em: 03 out. 2015.

ARTIGO 2

Efeito do pré-tratamento com dolomita (DMT) em pó na dentina desmineralizada de molares decíduos

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar alterações minerais e repercussões em propriedades mecânicas em dentina hígida e desmineralizada de molares deciduos após tratamento com dolomita (DMT) em pó, seguida de Cimento de Ionômero de Vidro (CIV). Foram preparadas cavidades classe I em 32 molares decíduos, divididos em G1 (dentina hígida) e G2 (dentina desmineralizada). A cavidade de classe I foi dividida em dois sítios, um deles foi isolado com esmalte (porção mesial) para obter uma área de sem-contato (área controle: SC) e contato (área teste: C) com DMT. As cavidades de 16 dentes (G1DMT, G2DMT) receberam aplicação do DMT e restauração de CIV. Os 16 dentes destinados aos grupos (G1 e G2) foram restaurados com CIV. Os espécimes foram fatiados e preparados para análise de microdureza Knoop, Micro Raman e FEG. As variáveis dentina (hígida e desmineralizada), tratamento (sem e com DMT) e interação (dentina e tratamento) foram analisadas com o teste ANOVA fatorial e pós-teste de Bonferroni nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Os resultados mostraram nas áreas SC: diferença significativa foi encontrada ao fator dentina ($p=0,0001$). Não foram encontradas diferenças significativas na interação dentina e tratamento ($p=0,238$). Na área C: não houve diferença significativa em relação à dentina ($p=0,391$). No entanto, houve diferença significativa na interação dentina e tratamento ($p=0,001$). As trocas minerais entre DMT, CIV e dentina desmineralizada podem induzir mudanças das propriedades mecânicas do substrato dentinário ao promover a incorporação de íons minerais. A aplicação direta da DMT no tecido desmineralizado alterou as propriedades químico-mecânica sem a necessidade de associar o CIV.

Palavras-chave: Remineralização dentária, Dentina, Dente decíduo, Cimentos de Ionômeros de vidro.

Effect of dentin pre-treatment with dolomite powder on dentin chemical mechanical properties in tridimensional cavities

Abstract

The aim of this study was to evaluate mineral changes and effects on mechanical properties in sound and demineralized dentin of deciduous molars after treatment with dolomite (DMT) powder, followed by glass ionomer cement (GIC). Class I cavities were prepared in 32 primary molars were divided into G1 (sound dentin) and G2 (demineralized dentin). The class I cavity was divided into two sites, one of which was insulated with nail polish (mesial portion) for a no-contact area (control area: SC) and contact (test area C) DMT. Sixteen teeth cavities (G1DMT, G2DMT) received pre-treatment of DMT and CIV restoration. Sixteen teeth for the groups (G1 and G2) were restored with CIV. The specimens were sliced and prepared for analysis of microhardness Knoop, Micro Raman and FEG. Dentin variables (sound and demineralized), treatment (with and without DMT) and interaction (dentin and treatment) were analyzed with factorial ANOVA and Bonferroni post-test at significance level of 5% ($\alpha = 0.05$). The results showed in areas SC: significant difference was found to dentin factor ($p = 0.0001$). There were no significant differences in the interaction dentin and treatment ($p = 0.238$). In Area C: there was no significant difference in relation to dentin ($p = 0.391$). However, there was significant difference in the interaction dentin and treatment ($p = 0.001$). The mineral exchanges between DMT, GIC and demineralized dentin can induce changes of the mechanical properties of the dentin to promote the incorporation of mineral ions substrate. The direct application of DMT in demineralized dentin altered the chemical-mechanical properties without the need to involve the GIC.

Keywords: Tooth remineralization, Dentine, Deciduous tooth, Glass ionomer cement.

INTRODUÇÃO

A Odontopediatria tem como objetivo a manutenção dos dentes decíduos no arco dentário até sua época de esfoliação fisiológica, o que representa a base fundamental para que a correta oclusão da dentição permanente obtenha êxito¹. A abordagem diante de uma situação clínica de cárie profunda em dentes decíduos, pode-se optar pela técnica da remoção parcial do tecido cariado¹ a qual consiste na remoção do tecido carioso não-remineralizável. A camada mais profunda do preparo cavitário (parede de fundo) não deve ser removida para evitar a exposição pulpar^{2,3}. De forma que, na situação clínica descrita é empregado o procedimento terapêutico do capeamento pulpar indireto (CPI)³. No qual, a camada de dentina infectada (superficial) com a presença da invasão bacteriana, extensa desmineralização, degradação de fibras colágenas, processos odontoblásticos e incapaz de remineralização é removida⁴. À indicação da técnica deve ser somada à ausência de dor espontânea, ausência de mobilidade nos tecidos periodontais ou outros sinais e sintomas. Estudos revelam que a escolha do material utilizado para proteção dentino-pulpar não tem demonstrado diferença significativa até agora, e sinaliza para a importância da cavidade se manter selada ao longo do tempo²⁻⁴.

Os cimentos de ionômero de vidro (CIV) são indicados para proteção pulpar indireta em virtude de sua capacidade de adesão à estrutura dentinária, coeficiente de expansão térmica e módulo de elasticidade similares ao do dente, além da liberação de flúor e biocompatibilidade quando aplicado sobre a dentina^{5,6,7}. Outra característica peculiar do CIV, consiste na sinérese e embebição após sua manipulação, o que pode resultar em degradação hidrolítica e consequentemente comprometer as propriedades mecânicas do CIV.^{8,9,10,11}. No entanto, a busca por materiais que permitam taxas elevadas de sucesso para o tratamento conservador da polpa é constante, a dúvida recai se o processo de reparo é à custa fisiológica do complexo dentino-pulpar ou do material utilizado? Ao considerar o processo de reparo como processo fisiológico, o desafio clínico reside na tentativa de melhorar a condição do substrato dentinário cariado, logo desmineralizado, para que ao receber o material restaurador possa promover maior longevidade das restaurações.

A busca por um biomaterial capaz de aprimorar as propriedades químicas e mecânicas do substrato dentinário desmineralizado, a partir da interação química com a dentina, foi proposto neste estudo ao incluir a dolomita (DMT) para aumentar

a quantidade de cálcio disponível ao alcalinizar o meio dentinário desmineralizado e selado.

A Dolomita brasileira (Gran-White) é um mineral comum das rochas, composto por carbonato duplo de cálcio e magnésio ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), rocha descoberta pelo geólogo francês Deodat Dolmieu, nos Alpes tirolezes (1750-1801)^{13,14}. Em reação química, precipita-se sob a forma de carbonatos de Ca e Mg, o que pode promover a cristalização através de um mecanismo de sedimentação da DMT¹⁵. De cor branca e textura finíssima, favorece a absorção e fixação do cálcio nos ossos e o magnésio presente na DMT ativa mais de 326 sistemas enzimáticos do corpo humano, considerados elementos fundamentais para o organismo¹³. A formação da DMT, segundo alguns estudos, é capaz de diminuir culturas de bactérias de superfícies^{13,15}. A partir da deposição dos cristais de DMT, a maturação e recristalização somado ao aumento da cristalinidade podem produzir um material altamente ordenado quimicamente, ou seja, estável^{15,16,17}. Além do que, as taxas de Mg/ Ca aumentam a precipitação do carbonato¹⁵. Sabe-se que em concentrações equilibradas de Fluoreto (F^{-1}); (maior que 0,05mM), a partir do processo de sorção, ocorre precipitação em Fluoreto de Cálcio (CaF_2) através da liberação de íons Ca^{+2} , provenientes do CaO ¹⁸. As mudanças nas concentrações e pH dos íons F^{-1} , Mg^{+2} e Ca^{+2} presentes na DMT, diminuem rapidamente e permanecem em equilíbrio após 24h¹⁸. O que se sabe, através de modelos em EDS de resíduos sólidos da DMT, é que a sorção de F^{-1} promove a formação da CaF_2 , ou seja, a DMT pode ser um potente adsorvente de F^{-1} . Contudo, não há estudos clínicos validando tais efeitos¹³⁻¹⁶, nem tampouco aplicações em Odontologia.

O estudo das trocas químicas entre materiais bioativos e tecidos dentais têm sido tema de pesquisas, nas alterações das propriedades físico-química das estruturas dentárias envolvidas¹⁹. Portanto, este estudo *in vitro* buscou avaliar a permuta química da DMT aplicada previamente à restauração de CIV, em dentina profunda de dente decíduo desmineralizado selada com CIV e avaliar as repercussões nas propriedades químico-mecânicas.

MATERIAL E MÉTODOS

A realização desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), sob protocolo #1.565.693.

Amostra

A amostra consistiu de 40 molares decíduos humanos hígidos, sem quaisquer defeito da coroa ou lesões de cárie. As porções radiculares foram removidas com uso de uma broca de alta rotação (2121 KG Sorensen®, Cotia, SP, Brazil) e os dentes foram armazenados em água destilada em temperatura ambiente para evitar a desidratação até o preparo cavitário.

Delineamento experimental

Dureza knoop, Micro Raman and FEG foram os testes utilizados para avaliar a dentina decídua nas seguintes condições: hígida/desmineralizada, tratada ou não-tratada com DMT em pó, com e sem contato com CIV. Para este experimento foram preparadas cavidades Classe I em 40 molares deciduous pré-selecionados, sendo que 8 foram perdidos durante o preparo cavitário. Sendo que, o estudo foi conduzido com 32 dentes. Os dentes foram divididos em 2 grupos (n=16) de acordo com a condição dentinária: hígido (G1), desmineralizado (G2). Subgrupos (n=8) foram formados para analisar isoladamente a ação do CIV e associado a DMT pó. As cavidades foram divididas em duas metades, em que uma delas foi isolada com esmalte de unha para compor a área controle de cada grupo. Todas as cavidades foram restauradas com cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (Ketac Molar Easymix®, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), mas somente G1DMT e G2DMT receberam a aplicação com pó de DMT antes da restauração (Figura 1).

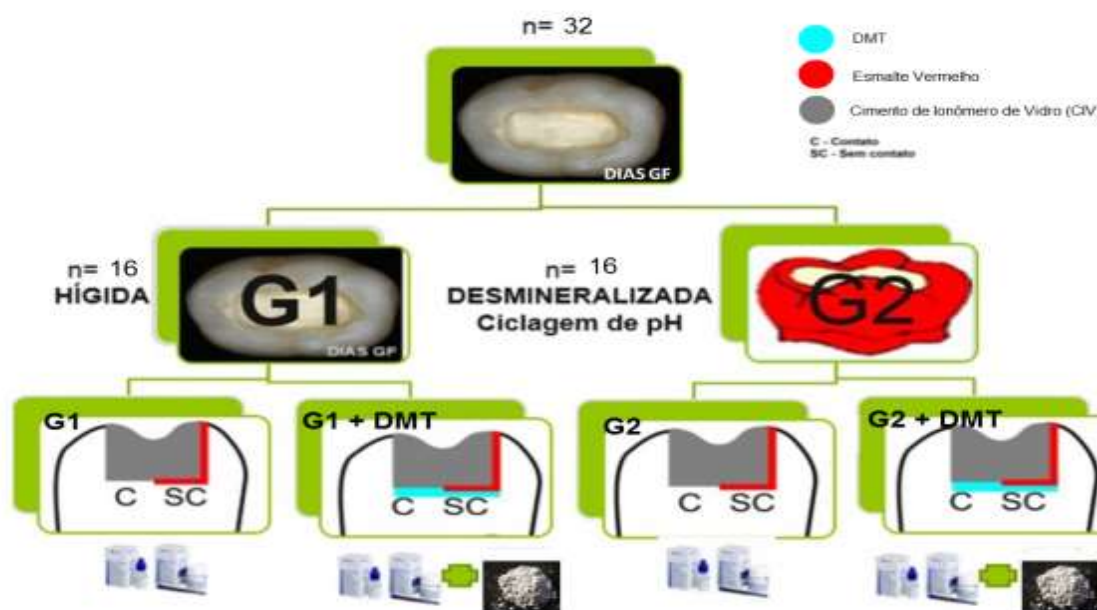


Figura 1– Corte sagital (A,B) dos dentes restaurados com CIV nas duas condições: dentina hígida (G1, G1 DMT) e desmineralizada (G2, G2 DMT) Camada de esmalte vermelho para evitar contato direto do CIV com a metade da dentina, para obter área de controle e área teste.

Preparo das cavidades Classe I

A máquina de preparos cavitários (El Quip®, São Carlos, SP, Brazil) foi utilizado para o preparo das cavidades Classe I, as quais foram padronizadas nas medidas de profundidade=3mm, comprimento=6 mm e largura=4 mm. O tamanho da cavidade foi conferido com o uso do paquímetro (Digimess®, São Paulo, SP, Brazil).

O preparo das cavidades foi padronizado com início no centro da superfície oclusal de cada molar decíduo. A broca de tungstênio #8 foi utilizado na profundidade inicial de 1.5 mm até alcançar a medida final de 3 mm com uma broca de alta rotação #3131, sob intensa refrigeração. Após 8 cavidades, as brocas eram repostas por novas. Para completar a etapa, todos os dentes eram imersos na cuba ultrassônica (Cristófoli Biosafety®, Campo Mourão, PR, Brazil) por 280s para remoção de debris decorrentes do preparo cavitário. O exame visual de todos os espécimes foi feito com lupa estereoscópica (10X) para verificar a existência de exposição pulpar pelo preparo cavitário, e na presença deste, o dente era descartado. Neste estudo foram perdidos 8 dentes na etapa do preparo cavitário, devido à exposição pulpar durante a confecção das cavidades. De forma que, o estudo foi concluído com 32 dentes.

Procedimentos para ciclagem de pH

Os dentes provenientes do grupo G2 ($n = 16$) foram submetidos a desmineralização dentinária para simular lesão de cárie utilizando o método de ciclagem de pH, de acordo com protocolo já utilizado¹¹. Para proteção da área externa da coroa dental foram aplicadas duas camadas de esmalte (Colorama®, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) e evitar contato com as paredes internas da cavidade.

Para estabelecer o ciclo DES-RE (desmineralização- remineralização), cada espécime foi imerso por 8h em solução desmineralizante e 16h em solução remineralizante^{20,21}. O volume das soluções desmineralizadora e remineralizadora foi de 10mL para cada dente em cada ciclo. O ciclo foi repetido por 14 dias consecutivos a temperatura ambiente sem agitação. As soluções utilizadas foram manipuladas no Laboratório Farmacêutico da UEPG. As formulações²⁰ foram as seguintes: solução desmineralizante (pH 4.8) com 2.2 mM cloreto de cálcio (CaCl_2); 2.2 mM fosfato de sódio (Na_2PO_4) e 50 mM ácido acético; solução remineralizante (pH 7.0): 1.5 mM cloreto de cálcio (CaCl_2), 0.9 mM fosfato de sódio (Na_2PO_4) e 0.15 mM cloreto de potássio (KCl).

Aplicação tópica da DMT em pó

A aplicação tópica da DMT em pó foi realizada somente nos grupos G1DMT e G2DMT. Após o condicionamento com ácido poliacrílico (condicionador ácido poliacrílico 11,5%, Nova DFL, Jacarepaguá, RJ, Brazil), foi realizado a aplicação tópica com DMT pó (Gran White, Ultrafarma, Brazil) sendo a quantidade padronizada com uma medida de pó dosador de CIV, e após levada à cavidade com auxílio de um porta-amálgama de plástico (Precision Maquira®, Maringá, PR, Brazil) durante o tempo de 1 min. Antes dos procedimentos restauradores, as cavidades receberam uma camada de esmalte no lado mesial das cavidades. O desenho da pesquisa estipulou a divisão da cavidade em dois lados; SC (área controle), C (área teste). A finalidade foi para garantir que o CIV não entrasse em contato direto com a

dentina, de forma que a DMT em pó fosse o único elemento em contato direto com a dentina.

Procedimentos Restauradores

Todas as cavidades foram restauradas com CIV de vidro de alta viscosidade (Ketac Molar Easymix®, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA). As cavidades foram tratadas com ácido poliacrílico Ketac liquid (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) por 10s, lavado e seco com jato de ar por 20s e preenchidas com CIV. O CIV foi dosado na proporção de 2:2 (pó e líquido) e manipulado no bloco de espatuação com a espátula plástica (Duflex®, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). A mistura foi inserida na cavidade com auxílio da Seringa Centrix (Precision Maquira®, Maringá, PR, Brazil) seguido da técnica “pressão digital” (30s) com a fita de poliéster (K-Dent Quimidrol®, Joinville, SC, Brazil). Para o CIV foi aguardado a presa por 3min e após protegido com uma camada de vaselina (Rioquímica®, São José do Rio Preto, SP, Brasil) na superfície, de acordo com as instruções do fabricante. Após a restauração, os dentes foram armazenados em estufa por 24h a 37°C, em ambiente úmido a 100% acomodado em umidificador.

Preparo dos espécimes

Os dentes foram fixados na máquina de corte (Isomet® 1000 Precision Saw Buehler, Lake Bluff, IL, USA) e seccionados verticalmente no sentido mesio-distal com disco de diamante (1.3 mm Precision Saw, Lake Bluff IL®, USA) na velocidade de 300 rpm para obter fatias dentárias (n=3) de aproximadamente 1,1 mm de espessura. Duas fatias foram separadas para o teste de Dureza e a terceira fatia foi levada para o teste de FEG. Duas fatias dentárias foram posicionadas no centro de cilindros de PVC (Tigre®, Joinville, SC, Brazil) de dimensões (12x20 mm), sendo colados com fita adesiva (3M®, Sumaré, SP, Brazil) em contato direto com a placa de vidro. O cilindros foram preenchidos com resina acrílica transparente (JET®,

Clear Field, SP, Brazil) pela técnica do pó e líquido. As fatias embebidas em acrílico foram levadas à máquina de polimento (Arotec®, Cotia, SP, Brazil). Uma sequência lixas de carbeto de sílcio (3M ® Brazil, Sumaré, SP, Brazil) foi utilizadas sob intensa irrigação de água. O polimento final foi realizado com pasta de diamante (Arotec®, Cotia, SP, Brazil) de granulação 1/4 µm. Para remoção dos resíduos os espécimes foram lavados em cuba ultrassônica por 12 min. Após, foram armazenados em estufa a 37°C por 24 h em um ambiente úmido a 100%, acomodado em umidificador.

Teste de Microdureza

A análise de microdureza foi realizada no microdurômetro (Shimadzu®, Kyoto, Japan) com uso do indentador Knoop. Por 30 s, foram aplicadas cargas de 25g para dentina hígida e 10g dentina desmineralizada²¹. As cargas foram aplicadas a 50µm (micrômetros) da base cavitária. Após, 3 medidas diferentes foram feitas com 100 µm entre cada um, na mesma profundidade no sentido horizontal. A média das 3 medidas foi considerada o valor de microdureza de cada espécime.

Avaliação dos íons em dentina pela microscopia electrónica de campo (FEG)

Para avaliação em FEG foram separadas, aleatoriamente, 2 fatias dentárias de cada grupo. Os espécimes foram previamente colados em stubs metálicos com uma fina camada de cianocrilato (Pegamil bondgel ultra strong, Sao José, SC, Brazil). Após, os espécimes foram armazenados por 48h para secagem prévia à leitura no FEG. A leitura foi realizada a 50µm de profundidade da base cavitária com 5000x de magnificação. As áreas de leitura foram divididas em áreas C e SC do material restaurador com a dentina, limite imposto para presença do esmalte vermelho, aplicado na base cavitária e paredes laterais, presente na hemicavidade. No FEG foi possível obter dois tipos de análise: EDS (Espectroscopia de Energia dispersiva) e EBSD (Difração de Elétrons Retroespalhados) de caracterização química e morfológica.

Espectroscopia Micro-Raman

As mesmas amostras utilizadas para o teste de microdureza foram submetidas à análise de composição mineral através de Espectroscopia Raman (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha). O aparelho foi calibrado primeiro a zero e, em seguida, para os valores de coeficientes utilizando uma amostra de silicone. O teste incluiu os seguintes parâmetros: um laser de néon com 532 nm de comprimento de onda e 20 mW, uma resolução espacial de ≈ 3 mM, a resolução espectral de ≈ 5 cm^{-1} , 20 s de tempo de acumulação e 5 colegas de adições com ampliação de 20x (Olympus UK, Londres, Reino Unido) para um laser ≈ 1 mm de diâmetro. As leituras foram feitas num gama espectral 300-1800 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos a partir da dentina logo abaixo da interface dente-restauração em um local aleatório com análise de mapeamento de três pontos: 0, 0,40 e 90 μm em profundidade.

A espectroscopia micro-Raman detectou o conteúdo químico da dentina através das características moleculares vibracionais de energia²². O espectro representativo de fosfato de cálcio (960 cm^{-1}), os picos de diferentes modos de vibração do grupo fosfato (591 cm^{-1} , 430 cm^{-1}), carbonato (1070 cm^{-1}), colagénio (1270 -1453 cm^{-1}) e pico de DMT (1080 cm^{-1}) foram identificados nas amostras²².

Análise Estatística

A distribuição de normalidade foi verificado com D'Agostino & Pearson and Shapiro Wilks; a homogeneidade das variâncias foi testada com o teste de Levene. Os dados de dureza foram analisados utilizando ANOVA 2 critérios, dos fatores dentina (G1-hígida; G2-desmineralizada), tratamento (com e sem DMT pó) e interação entre tratamentos e dentina. O nível de significância utilizado foi de 5% ($\alpha = 0.05$). Os dados de micro-Raman e FEG foram analisados qualitativamente por grupos. Todos os cálculos foram realizados por meio dos programas estatísticos

GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

RESULTADOS

Houve diferença significativa em valores de dureza no tratamento com DMT, nas áreas de SC e C ($p < 0,001$). Ou seja, aplicação do CIV associada à DMT (C) foi significativo tanto em G1 quanto G2. E nas áreas SC, ou seja, a ação da DMT isolada promoveu aumento de valores de dureza significativos tanto para G1 quanto para G2. Houve diferença significativa para o fator dentina em SC ($p < 0,0001$), ou seja, a DMT isolada na ausência do CIV quando aplicada em dentina desmineralizada (G2) promoveu o aumento significativo de valores de dureza dentinária. Na interação dentina e tratamento, em ambas as áreas SC ($p = 0,238$) e área C ($p = 0,391$), não houve diferença significativa nos valores de dureza dentinária (Figura 2).

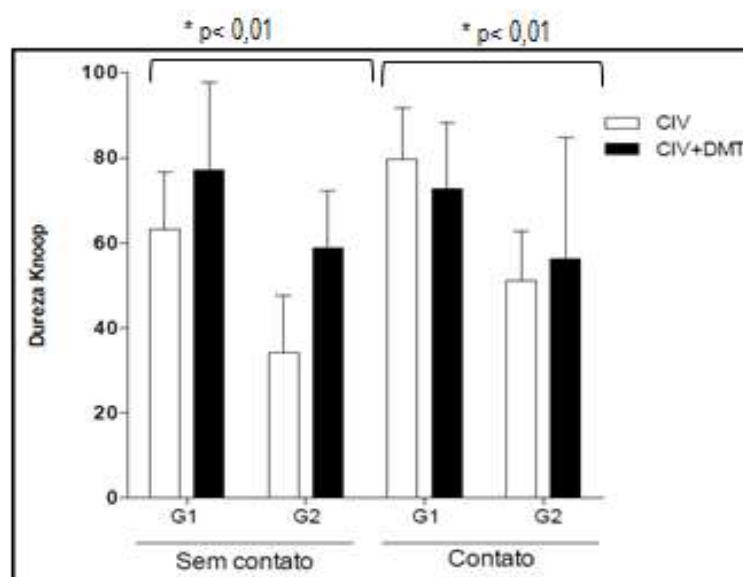


FIGURA 2 – Média e desvio padrão de valores de Dureza Knoop. (*) Diferenças significativas para o fator dentina nas áreas sem contato (área controle) e área de contato (área teste). Fator dentina apresentou diferenças significativas para áreas SC ($p < 0,01$) e sem diferenças significativas na área de C ($p = 0,391$). Interação (fator dentina e tratamento) não apresentaram diferenças significativas de acordo com a área avaliada SC ($p = 0,232$) e C ($p = 0,391$). Anova 2 critérios.

Os dados obtidos no Micro-Raman por espectroscopia estão demonstrados nas figuras (6,7,8,9). O intervalo da região espectral envolvida (275 - 1700 cm^{-1}) foi identificado em todos os grupos, sendo que a maior intensidade dos picos indicados, estão listados a seguir: 1- 960 cm^{-1} , 591 cm^{-1} e 430 cm^{-1} (picos de diferentes modos vibracionais do grupo fosfato) representante da hidroxiapatita do cálcio, 2 - 1070 cm^{-1} (carbonato) representante do produto formado pelo CIV dentro das fibras colágenas²¹ e 3 - 1080 cm^{-1} pico da DMT encontrada nos grupos G1 DMT e G2 DMT.

No espectro Micro-Raman do grupo G1C dos molares decíduos (Figura 6), dentro do intervalo da região espectral envolvida (300-1700 cm^{-1}) foram caracterizados 5 espectros na absorbância no intervalo de 0-4000. Em que, 1270-1453 cm^{-1} encontra-se a banda correspondente ao colágeno, próximo de 1070 cm^{-1} correspondente ao carbonato e intervalo 960 cm^{-1} grupo fosfato. De acordo com as três profundidades analisadas (0, 45 e 90 μm) em relação à base cavitária, houve diferença no correspondente ao fosfato, sendo este encontrado maior pico na base cavitária comparado às outras duas profundidades analisadas. No espectro Micro-Raman do grupo G1 SC (Figura 3) nas três profundidades analisadas, o pico 960 cm^{-1} correspondente ao fosfato foi maior na profundidade de 90 μm .

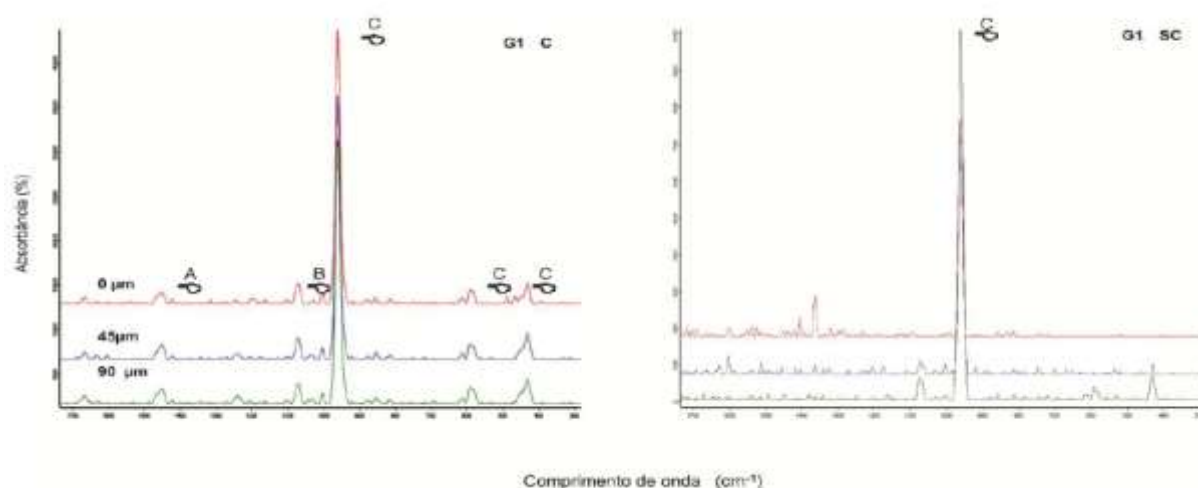


FIGURA 3 - Espectros obtidos a partir da análise da composição da dentina por espectroscopia de micro-Raman grupo G1. G1 C (dentina hígida tratado com CIV), G1 SC (dentina hígida sem contacto com o CIV). As setas indicam: (A): colágeno; (B): carbonato; (C) Fosfato

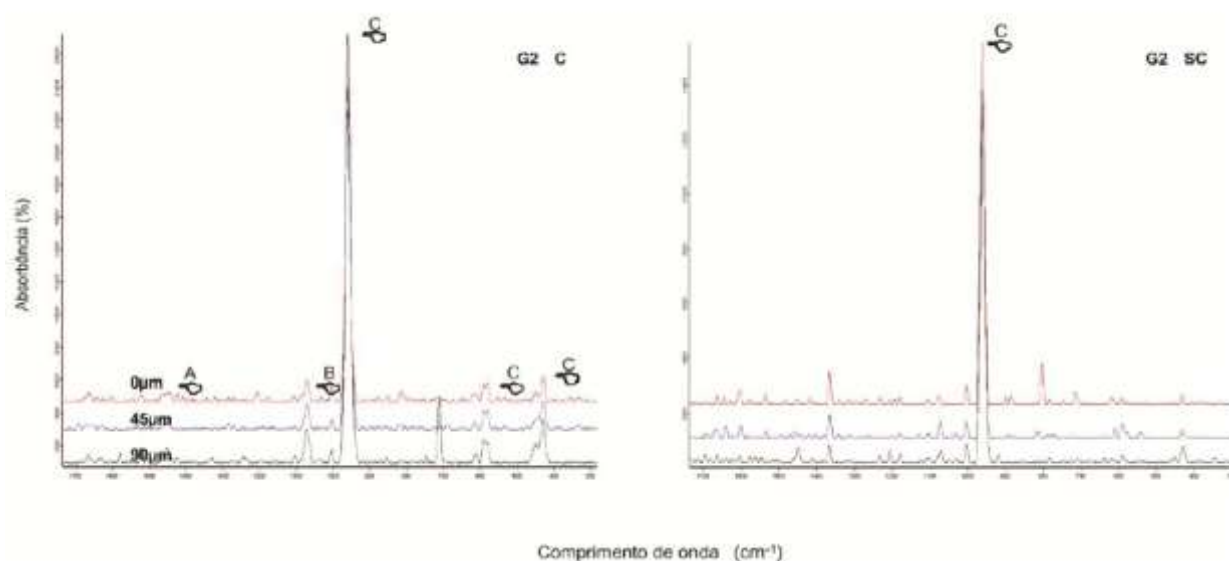


Figura 4 - Espectros obtidos a partir da análise da composição da dentina por espectroscopia de micro-Raman grupo G2. G2 C (dentina desmineralizada tratado com CIV), G2 SC (dentina desmineralizada sem contacto com o CIV). Houve um aumento no teor mineral de Fosfato: grupos G2 houve aumento da intensidade dos picos: fosfato, carbonato e colágeno. As setas indicam: (A): colágeno; (B): carbonato; (C) Fosfato.

No espectro micro-Raman do grupo G2 C (Figura 4) dos molares decíduos, dentro do intervalo da região espectral envolvida ($300\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) foram encontrados 5 espectros na absorvância no intervalo de $0\text{-}2800$. Representado por $1270\text{-}1453\text{ cm}^{-1}$, encontra-se a banda correspondente ao colágeno. Em 1070 cm^{-1} está caracterizado carbonato, no intervalo de 960 cm^{-1} correspondente ao grupo fosfato. De acordo com as três profundidades analisadas, houve diferença no pico 960 cm^{-1} correspondente ao fosfato, o qual foi maior na profundidade de $90\text{ }\mu\text{m}$ comparado às outras duas profundidades. No espectro Micro-Raman do grupo G2 SC (Figura 4), dentro do intervalo da região espectral envolvida ($300\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$), no intervalo de absorvância de $0\text{-}1500$, houve diferença no pico 960 cm^{-1} correspondente ao fosfato sendo este maior na base cavitária comparado às outras duas profundidades analisadas.

No espectro Micro-Raman do grupo G1 DMT C (Figura 5), dentro do intervalo da região espectral envolvida ($275\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) foram caracterizados os espectros do grupo fosfato na absorvância no intervalo de $0\text{-}1500$. Ao analisar as três profundidades (0 , 45 e $90\text{ }\mu\text{m}$) em relação à base cavitária, o maior pico de absorvância foi encontrado na base cavitária. No espectro micro-Raman do grupo G1 GMT SC (Figura 8), dentro do intervalo da região envolvida ($275\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) no

intervalo de absorvância (0-1500) houve diferença nas análises das três profundidades, sendo o nível de maior absorvância encontrado na base cavitária. O pico da DMT não foi identificado.

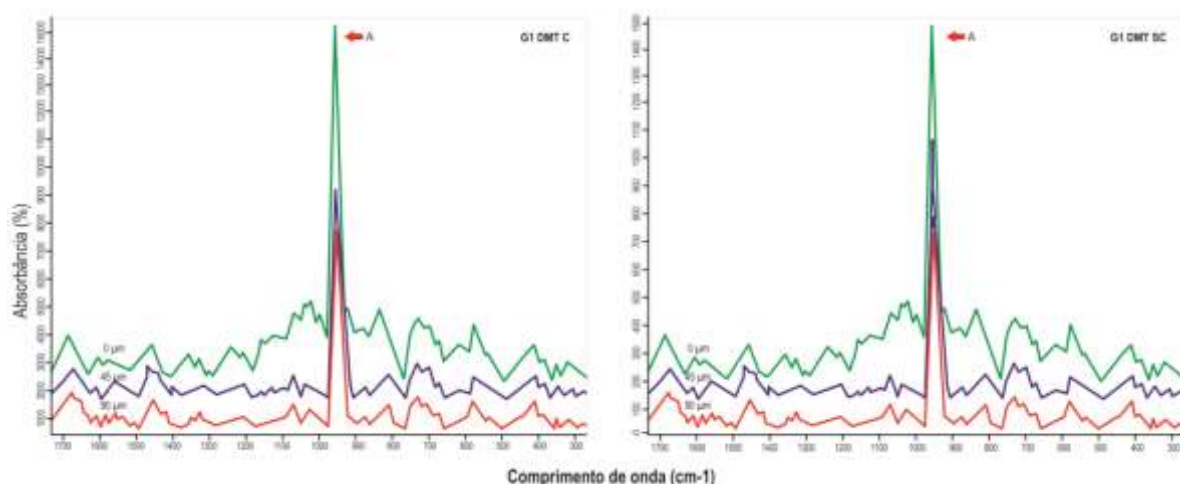


FIGURA 5 - Espectros obtidos a partir da análise da composição da dentina por espectroscopia de micro-Raman grupo G1 DMT. G1 DMT C (dentina hígida tratada com CIV+ DMT), G1 DMT SC (dentina hígida tratada DMT, sem contato com CIV). Absorvância maior encontrada na base da cavidade em ambos os grupos (C, SC), a seta indica (A): Fosfato

No espectro micro-Raman do grupo G2 DMT C (Figura 6), dentro do intervalo da região espectral envolvida ($275\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) foram caracterizados 3 espectros na absorvância no intervalo de 0-1300. O pico do fosfato foi evidenciado em dois intervalos, sendo eles 960 cm^{-1} e 591 cm^{-1} . O pico maior do fosfato foi encontrado na base cavitária. A DMT foi identificada no pico 1080 cm^{-1} . No espectro micro-Raman do grupo G2 DMT SC (Figura 6), dentro do intervalo da região envolvida ($275\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) a profundidade $90\mu\text{m}$ obteve maior pico do fosfato

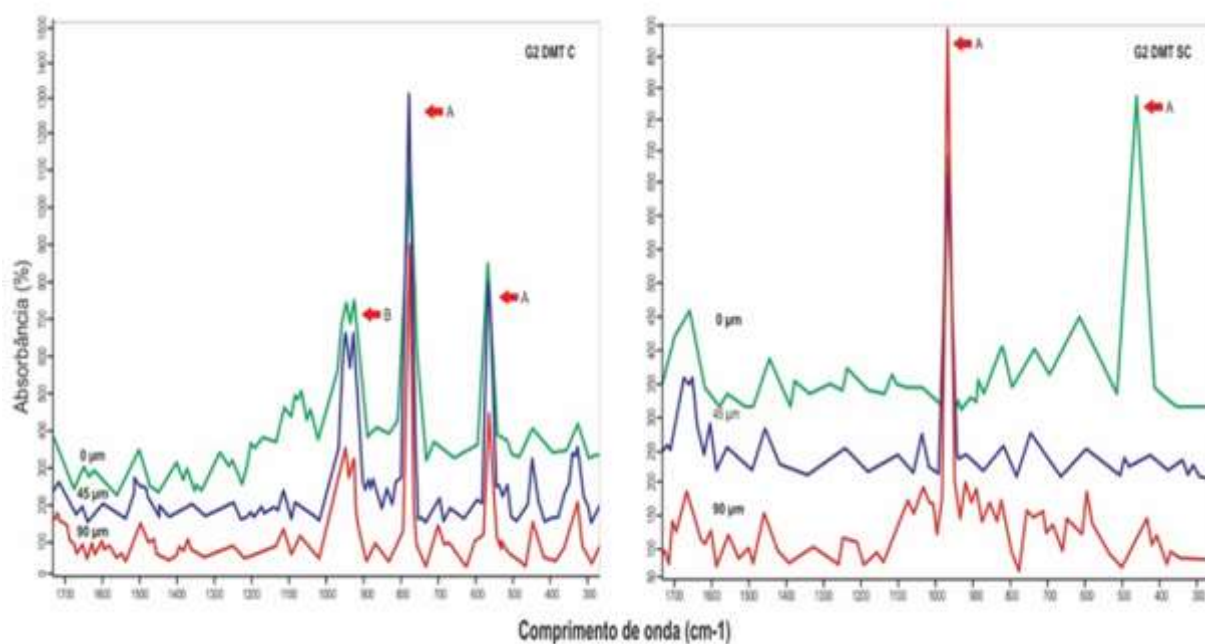


FIGURA 6 - Espectros obtidos a partir da análise da composição da dentina por espectroscopia de micro-aman grupo G2 DMT. G2 DMT C (dentina desmineralizada tratado com CIV + DMT), G2 DMT SC (dentina desmineralizada tratada com DMT, sem contato com CIV. As setas indicam: (A) fosfato; (B) dolomita.

As micrografias representativas em FEG dos picos dos íons (Ca, P e F) nos diferentes grupos pode ser observado abaixo (Figura 10). Pode se verificar que os houve um pico dos íons Ca em G2 DMT C, com valores próximos de G1 DMTSC. O que pode sugerir alta reatividade da DMT com a dentina desmineralizada.

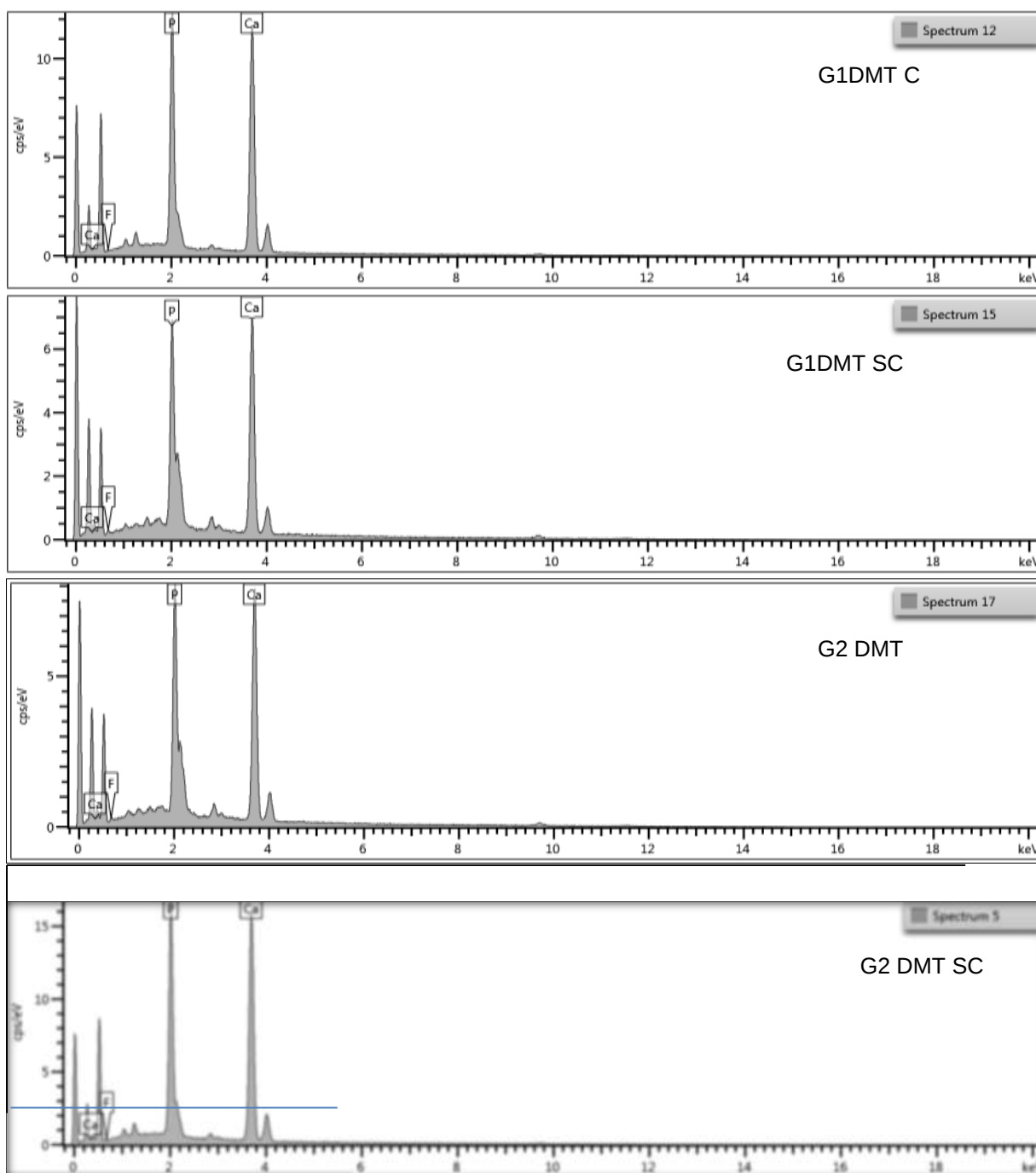


FIGURA- 10: Microscopia eletrônica de varredura representativa de desgaste superficial. (G1C) dentina hígida tratada com DMT; (G1SC) dentina hígida tratada com DMT; (G2C) dentina desmineralizada tratada DMT e CIV; (G2SC) dentina desmineralizada tratada com DMT; Picos dos íons Ca (cálcio), P (fósforo) e F (Flúor).

DISCUSSÃO

Simular *in vitro* a dinâmica da lesão de cárie tem sido o método adotado nos experimentos que avaliam os materiais que estão em contato com a dentina cariada^{21,22,23}. A dentina desmineralizada obtida por meio de lesão artificial de cárie criada pelo método de ciclagem de pH modificado^{20,21}, tenta simular a dinâmica da saturação mineral associada à variação de pH do processo de formação de cárie natural. Este método laboratorial é considerado adequado para avaliar a perda e ganho mineral do substrato dentário^{22,23}. Marquezan et al. (2009)²¹ encontraram nos espécimes perda mineral com expressiva redução de dureza, alcançando quase a metade do valor da dentina hígida de dentes decíduos (34 KHN). Alguns estudos avaliaram valores de trocas iônicas entre dentina e material restaurador em lesões artificiais de cárie, e concluíram que o método *in vitro* permite estudos detalhados das interações entre material restaurador e dentina desmineralizada^{19,24}. Os valores médios, de acordo com estudo empregado por Marquezan et al. (2009)²¹, no teste de dureza a dentina decídua íntegra varia de 50 a 70 KHN, e na dentina desmineralizada são abaixo de 50 KHN geralmente em torno de 30 KHN.

Houve diferença significativa em valores de dureza no tratamento com DMT, nas áreas de SC e C ($p < 0,001$). Ou seja, aplicação do CIV associada à DMT (C) foi significativo tanto em G1 quanto G2. E nas áreas SC, ou seja, a ação da DMT isolada promoveu aumento de valores de dureza significativos tanto para G1 quanto para G2. Houve diferença significativa para o fator dentina em SC ($p < 0,0001$), ou seja, a DMT isolada na ausência do CIV quando aplicada em dentina desmineralizada (G2) promoveu o aumento significativo de valores de dureza dentinária. Na interação dentina e tratamento, em ambas as áreas SC ($p = 0,238$) e área C ($p = 0,391$), não houve diferença significativa nos valores de dureza dentinária. Nesta pesquisa a dentina desmineralizada (G2 DMT) foi o substrato mais reativo, pois houve maior aumento percentual de íons, tanto em SC como C. O que sugere que a aplicação da DMT foi o depositador direto de minerais em dentina, o que pode ter contribuído para o incremento das propriedades químicas do substrato dentinário. Visto que, sabe-se que em dentina desmineralizada ocorre perda de mineral, tanto na dentina peritubular quanto intertubular^{25,26,27}.

A aplicação de substância no remanescente dentinário desmineralizado tem sido considerado capaz de promover alterações no substrato aplicado^{2,10,27,28,29}. Neste estudo, os resultados do FEG revelaram incremento dos picos dos íons Ca, P e F nos diferentes grupos. Pôde-se verificar que houve um pico dos íons Ca em G2 DMT C, com valores próximos de G1 DMT SC. O que pode sugerir, alta reatividade da DMT com a dentina desmineralizada. A DMT é composta por Ca, o que acarreta em altos valores de liberação deste íon^{30,31,32}.

Na avaliação em micro-raman, o grupo G2 DMT SC obteve o maior pico do fosfato na profundidade 90µm, o que evidencia a presença da DMT nas alterações químicas no substrato dentinário desmineralizado. Outro fator de importância, é que estudos têm revelado que a composição da dentina, esmalte e cemento concentram altos valores de Magnésio (Mg)³³. O qual presente na DMT poderia afetar no metabolismo de mineralização, a partir do aumento de gradiente do íon Mg. O Mg influencia no metabolismo de mineralização, diretamente por efeitos do processo de cristalização na fase mineral inorgânica^{33,34,35, 36}. A ação da DMT pode consistir em 'repositora' de Mg e Ca, ao causar um aumento do gradiente de íons de cálcio/fosfato no substrato receptor³⁴. Em estudos em que a DMT foi escolhida como material de reparo por sua composição rica em Ca e Mg, estes minerais foram fundamentais na constituição da matriz óssea inorgânica^{30,35}. De forma que, a DMT possa ser um estímulo de ação osteogênica, ao desempenhar um papel coadjuvante na formação de novos complexos minerais em contato com a dentina³⁷. Os dados da composição química superficial da DMT considerou ação efetiva de formação de CaF_2 ^{34,35}. Sendo coincidente com os valores elevados dos minerais Ca, P e F realizados neste estudo, através do FEG e diferenças significativas em teste de dureza na região em que a DMT teve ação direta. Em relação aos resultados do Micro-Raman, a dentina desmineralizada em contato direto revelou a presença da DMT, o que sugere sua estabilidade e alcalinização do meio ao promover elevados índices também de fosfato^{30,32,35}. Desta forma, mais estudos poderão ser feitos para analisar a possibilidade de utilização da DMT como constituinte de material odontológico, uma vez que este estudo revelou a estabilidade no meio para o tratamento da dentina desmineralizada.

No entanto, a escassez de informação da DMT relacionada ao campo de material odontológico não acarreta em conhecimento de mecanismos de remineralização da lesão de cárie no uso da DMT. As informações presentes na

literatura estão limitadas à parte química e de sintetização da DMT, de modo que a reatividade deve ser melhor explorada em relação à bioatividade principalmente pela diferença significativa encontrada na dentina desmineralizada em contato direto com a DMT.

O presente estudo utilizou dados de dureza que propiciaram valores elucidativos das propriedades mecânicas de dentes decíduos, aliado às transformações da composição química dentinária através do FEG e Micro-Raman. Os dados podem prever o modelo de comportamento da interação dentina, DMT e CIV. A pesquisa mostrou que propriedades mecânicas de dentes decíduos em níveis microscópicos são altamente dependentes das características microestruturais química e mecânicas dos materiais utilizados em contato direto com a estrutura desmineralizada, capaz de alterar composição mineral e repercutir na melhoria das propriedades químico-mecânicas das estruturas envolvidas.

CONCLUSÃO

A DMT constitui uma alternativa potencial no tratamento de dentina desmineralizada, devido às alterações das propriedades químico-mecânicas da dentina decídua desmineralizada.

REFERÊNCIAS

1. Dalpian DM, Casagrande L, Franzon R, Dutra GMC, Araujo FB. Dentin Microhardness of Primary Teeth Undergoing Partial Carious Removal. *J Clin Pediatr Dent* 2012; 36(4):363–368
2. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. *Pediatr Dent* 2009;30: 170–174
3. Casagrande L, Bento LW, Rerin SO, Lucas Ede R, Dalpian DM, de Araujo FB. In vivo outcomes of indirect pulp treatment using a selfetching primer versus calcium hydroxide over the demineralized dentin in primary molars. *J Clin Pediatr Dent* 2008; 33:131–135
4. Casagrande L, Dalpian DM, Bento LW, Garcia-Godoy F, Araujo FB. Indirect pulp treatment in primary teeth after long-term function. *Am J Dent* 2010, 23:34–38.

5. Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, Spolidorio DM, de Souza Costa CA, Hebling J. Clinical and microbiological performance of resinmodified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal. *Clin Oral Investig* 2009; 13:465–471
6. Calvo AFB, Kicuti A, Tedesco TL, Braga MM, Raggio DP. Evaluation of the relationship between the cost and properties of glass ionomer cements indicated for atraumatic retorative treatment. *Braz Oral Res.* 2016;30:e-8
7. Bonifácio CC, Kleverlaan CJ, Raggio DP, Werner A, Carvalho RC, Amerongen WE. Physical-mechanical properties of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment. *Aust Dent J.* 2009; 54(3):233-7
8. Paschoal MA, Gurgel CV, Rios D, Magalhaes AC, Buzalaf MA, Machado MA. Fluoride release profile of a nanofilled resin-modified glass ionomer cement. *Braz Dent J.* 2011; 22(4):275-9
9. Hattab FN, Amin WM. Fluoride release from glass ionomer restorative materials and the effects of surface coating. *Biomaterials.* 2001; 22(12):1449-58
10. Gugliemi CA, Raggio DP, TaKeuti ML, Camargo LB, Imparato JC. Fluoride release and uptake of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment. *Pesq. Bras. Odontoped Clin Integr.* 2011;11(4): 561-5
11. Berh M, Rosentritt M, Loher M, Kolbeck C, Trempler C, Stemplinger B et al. Changes of cement properties caused by mixing errors: the therapeutic range of different cement types
12. Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 2001; 65(5): 456-62
13. Cordeiro, A. P. B.; Moreira, L. M. A. Proliferação celular e quebras cromossômicas em células submetidas à ação da Dolomita brasileira (Gran-White) in vitro. *Rev Ciênc Méd Biol, Salvador* 2004;3 (2):181-187
14. Slomski, G; Odle, T. "Dolomite." *Gale Encyclopedia of Alternative Medicine.* 2005
15. Zhang F, Xu H, Konishi H, Kemp JM, Roden EE, Shen Z. Dissolved sulfide-catalyzed precipitation of disordered dolomite: Implications for the formation mechanism of sedimentary dolomite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 2012; 97:148-165
16. Bontognali TRR, Vasconcelos C, Warthmann RJ, Bernasconi SM, Dupraz C, Strohmenger CJ and Mc Kenzie JÁ. Dolomite formation within microbial mats in the coastal sabkha of Abu Dhabi. *Sedimentology* 2010; 57: 824-844

17. Deng S, Dong h, Lv G, Jiang H, Yu B and Bischoff ME. Microbial dolomite precipitation using sulfate reducing and halophillic bacteria: Resultados from Qinghai Lake. *Chem. Geol* 2010(278): 151-159
18. Sasaki k. Yoshida m, Ahmad Bshir, Fukumoto N, Hirajima T. Sorption of fluoride on partially calcined dolomite. *Phsyicochem Eng. Aspects* 2013;(435)56-62
19. Ngo, H. C.; Mount, G.; McIntye, J.; DO, L. An in vitro model for the study of chemical exchange between glass ionomer restorations and partially demineralized dentin using a minimally invasive restorative technique. *J Dent* 2011;39(2):20-6
20. Ten Cate, J. M.; Duijster, P. P. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Research* 1982; 16: 201-10
21. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, GuedesAC. Artificial methods of dentine caries induction: hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol.* 2009 Dec;54(12):1111-7
22. Sauro S, Thompson I, Watson TF. Effects of common dental materials used in preventive or operative dentistry on dentin permeability and remineralization. *Oper Dent.* 2011 Mar-Apr;36(2):222-30
23. Todd, M. A.; Staley, R. N.; Kanellis, M. J.; Donly, K. J.; Wefel, J. S. Effect of a fluoride varnish on demineralization adjacent to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;116(2):159-67
24. Bezerra AC, Novaes RC, Faber J, Frencken JE, LEAL SC. Ion concentration adjacent to glass-ionomer restorations in primary molars. *Dent Mater* 2012;28(11):259-63
25. Mizoguchi T, Nagasawa S, Takahashi n, Yagasaki H, ITO M. Dolomite supplementation improves bone metabolism through modulation of calcium-regulating hormone secretion in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2005;23:140–146
26. Stark K, Meier W. Prevenções e cura com pedras: a mais pura energia. *Robafim* 2002 (2): 57-58
27. Zavgorodniy, AV et al. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol* 2008; 53(2):124-32
28. Lula ECO, Monteiro –Neto V, Alves CMC, Ribeiro CCC. Microbiological analysis after complete or partial removal of carious dentin in primary teeth: a randomized clinical trial *Caries Res* 2009; 43: 354-358
29. Ricketts DNJ, Kidd EAM, Innes N, Clarkson J. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. *Cochrane Database Syst Ver* 2006; 19: CDC003808

30. Duda; Losso, 2005 Kenward PA, Goldstein RH, Gonzalez LA, Roberts já (2009) Precipitation of low temperature dolomite from na anaerobic microbial consortium: The role of methanogenic. *Archae. Geobiology* 7 (5): 556-565
31. LeGeros, R.Z. et al. Phosphate minerals in human tissues. *Phosphate Minerals* 1984 Springer Verlag, Berlin, Germany:351-385
32. Steinfort, J., et al. The distribution of magnesium in developing rat incisor dentine. *J Dent Res* 1991; 70:187–191
33. Mizoguchi T, Nagasawa S, Takahashi N, Yagasaki H, Ito M. Dolomitesupplementation improves bone metabolism through modulation of calcium-regulating hormone secretion in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2005; 23: 140–146
34. Bhatnagar A, Kuar E, Silanpaa M. Fluoride removal from water by adsorption-a review. *Chem Eng. J* 171 (2011): 811-840
35. Kawai S, Pina CM, Bubendorf A, Feesler G, Glatzel T, Gnecco E, Meyer E. Systematic study of the dolomite (104) surfasse by bimodal dynamics force microscopy in ultra high vacuum. *Nanotechnology* 24 (2013) 055702 (9pp).

ARTIGO 3

Chemical exchange between dentin pre-treatment with CPP-ACP and GIC on demineralized dentin in deciduous molars

Abstract

Background. The casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) has been proposed for use as effective remineralizing agent.

Aims. To evaluate the chemical exchange between restoration of glass ionomer cement of high viscosity (GIC) and the effect of pretreatment with CPP-ACP in primary demineralised dentin through hardness changes from uptake of calcium, phosphate and fluoride.

Design. Class I cavities were prepared in 40 sound primary molars and the sample was divided in two groups (n=20) according to dentin condition: sound (1) and demineralized (2). Sub-groups (n=10) were formed to investigate the isolated action of the GIC or the association with CPP-ACP. This in vitro study examined the chemical exchange under two conditions: sound and demineralized dentin (pH cycling) to simulate the mineral loss occurs for the caries lesion. Groups G1 and G2 received GIC restoration only; groups G1CPP-ACP and G2CPP-ACP received CPP-ACP paste before GIC restorations. The specimens were prepared for Knoop hardness test, FEG and EDS. Statistical analysis used ANOVA two-way test ($\alpha = 0.05$). FEG and EDS data were qualitatively described.

Results. Increased hardness was observed in all the sites of direct contact with GIC in sound and demineralized dentin for all groups ($p < 0.001$); no difference was observed in microhardness after application of CPP-ACP ($p > 0.05$). In the evaluation of FEG and EDS, the direct contact of the GIC/dentin in sound and demineralized dentin resulted in increased peak of phosphate.

Conclusion. The exchange between the GIC and demineralized dentin may induce changes of mechanical properties of the substrate and the uptake of mineral ions.

Keywords: Dental cavity, Dentine, Deciduous tooth, Glass ionomer cement.

INTRODUCTION

Actually, the scientific community advocates dentistry based on the principles of minimal intervention. What is in the clinical situation of deep carious lesions, reduced thickness of remaining dentin (less than 0.5 mm), prevail the use of procedures that preserve tooth structure, among them, the partial removal of caries¹. So, is indicated using biocompatible materials, which applied in dentin are able to allow and / or promote tecdual repair². Concomitantly, promote proper sealing of the tooth-restoration interface and decrease the possibility of microleakage³ The study of chemical exchanges between bioactive materials and hard dental tissues provides information about changes in the physicochemical properties of dental structures involved⁴.

The casein protein derived from milk, has been studied in the literature as remineralizing agent of dental tissues and potential anticariogenic^{5,6}. The supersaturation stability in the oral environment promotes high levels of calcium ions and phosphate on the tooth surface, making the gradient of these ions can promote remineralized dental struture⁶. The casein phosphopeptide known by the acronym CPP binds to amorphous calcium phosphate (ACP) forming the CPP-ACP complex (phosphopeptide amorphous calcium phosphate, casein)^{6,7}. The CPP-ACP has the capacity to donates calcium ions and phosphate to tooth structure through

nanoparticles with dental structure⁸. So that by releasing calcium and phosphate ions in dental plaque in supersaturated state, it is able to promote the remineralization process. In order that the CPP-ACP acts as a reservoir of these ions in a state of supersaturation respect to dental tissues⁹.

The remineralization technology, based on calcium phosphate are promising non-invasive alternative in the management techniques of caries lesions^{8,9}. The evidence accumulated in the literature on the effectiveness of the derivatives of casein, mainly CPP-ACP, in preventing and reversing caries aroused interest in evaluating the effectiveness of these products in demineralized dentin and sealed. This study aims to evaluate in vitro the CPP-ACP (MI Paste, GC Corporation, Tokyo, Japa) as a pretreatment to the glass ionomer cement (GIC) use in dentin subjected to atraumatic restorative treatment and its impact on chemical-mechanical properties of the deciduous dentin.

MATERIAL AND METHOD

This research was approved by the Ethics in Research Committee, protocol # 1.565.693.

Sample

The sample consisted of 40 primary molars without any crown defects or carious lesions. The remaining root portions were removed using a high-speed diamond bur (2121 KG Sorensen®, Cotia, SP, Brazil), and the teeth were stored in distilled water at room temperature to avoid dehydration until cavity preparation.

Study Design

Knoop hardness, EDS and FEG tests were used to evaluate the following dentin conditions: sound/demineralized, treated or not treated with CPP-ACP paste and with/without contact with GIC. For this purpose, class I cavities were prepared in the 40 selected primary molars. The teeth were divided into 2 groups (n=20) according to the dentin condition: sound (G1) and demineralized (G2). Subgroups (n=10) were formed to analyze the isolated action of the GIC and the action associated CPP-ACP.

The cavities were divided into halves, one of which was isolated with nail varnish, thus ensuring a control area in each group (Figure 1). All cavities were restored with a high-viscosity glass ionomer cement, but only G1CPP-ACP and G2CPP-ACP received a pretreatment with CPP-ACP before restoration (Figure 1).

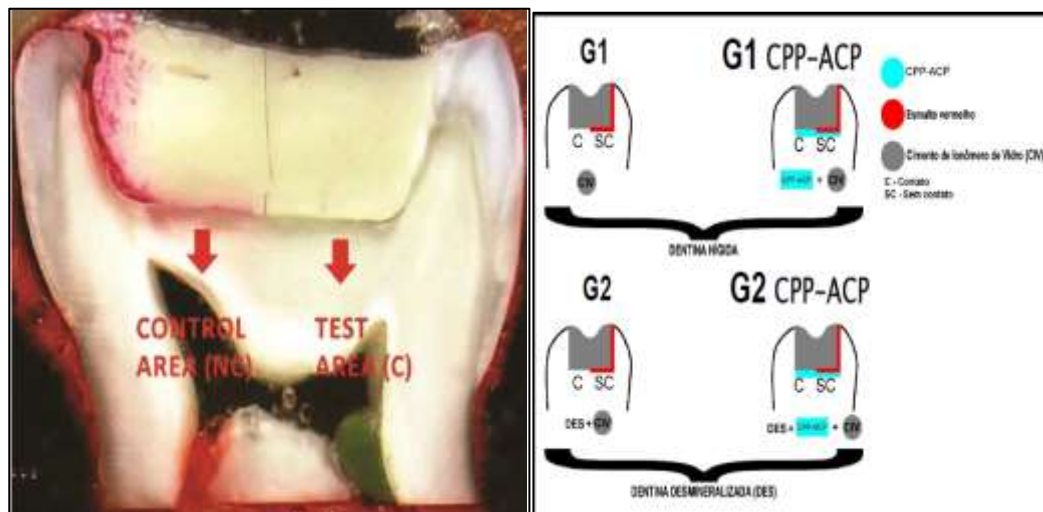


Figure 1- Sagittal section of teeth restored with GIC in two dentin conditions: sound/demineralized (G1, G2) and with topical application of CPP-ACP paste before restoration (G1CPP-ACP, G2CPP-ACP). Red nail varnish layer has been applied to avoid direct contact of GIC with the half of the dentin - control area (NC) and test area (C).

Preparation of the class I cavities

A drilling apparatus (El Quip ®, São Carlos, SP, Brazil) was used in the preparation of the cavities, which were standardized (depth=2 mm, length=6 mm and wide=4 mm). The size of the cavities was checked with a caliper (Digimess®, São Paulo, SP, Brazil).

The preparation of the cavities was started in the center of the occlusal surface of each primary molar. Tungsten carbide burs #8 with an initial depth of 1.5 mm were used to reach the final size set at 2mm with a diamond high rotation #3131, under continuous cooling. After 8 cavities, drills were replaced by new ones. To complete this step, the teeth were taken to the ultrasonic tank (Cristófoli Biosafety ®, Campo Mourão, PR, Brazil) for 280s to remove debris from the cavity preparation. Visual examination of specimens with a stereoscopic magnifying glass (10X) allowed verification of whether the pulp chamber was exposed by cavity preparation. If so, the tooth was discarded.

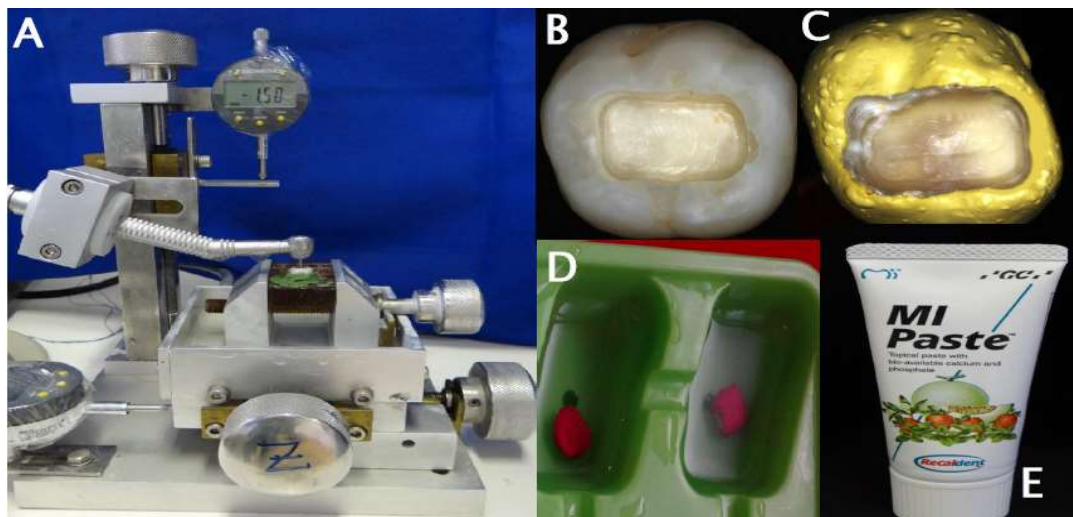


Figure 2 – A –Preparation of Class I Cavities ; B- Cavity prepared; C- Specimen prepared for pH cycling; D- Procedure for pH cycling; E – CPP-ACP Mi Paste

Procedures for pH cycling

The teeth of G2 (n = 20) were subjected to dentin demineralization to simulate carious lesions using the method of pH cycling according to the protocol already used¹¹. To protect the external area of dental crowns, two layers of nail varnish (Colorama ®, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were applied, avoiding contact with the walls of the cavity.

To establish the DES-RE cycle, each specimen was immersed for 8 h in demineralizing solution and for 16 h in remineralizing solution. The volume of the demineralizing and remineralizing solution was 10 ml for each tooth in every cycle. This cycle was repeated for 14 consecutive days at room temperature without stirring. The solutions used in pH cycling were manipulated in the Pharmaceutical Science Lab at UEPG. The formulations¹⁰ were as follows: demineralizing solution (pH 4.8) with 2.2 mM calcium chloride (CaCl_2); 2.2 mM phosphate Sodium (Na_2PO_4) and 50 mM acetic acid; and remineralizing solution (pH 7.0): 1.5 mM calcium chloride (CaCl_2), 0.9 mM phosphate Sodium (Na_2PO_4) and 0.15 mM potassium chloride (KCl).

The restorative procedures were carried out right after the DES-RE cycle was finished for all the specimens.

Restorative Procedures

All cavities were filled with high-viscosity GIC (Ketac Molar Easymix®, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA).

The protocol used is described above. The cavities were treated with Ketac liquid (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) for 10s, washed with air/water spray for 20 s, dried with a gentle stream of dry compressed air and immediately filled with the GIC. The GIC was dosed at a ratio of 2:2 (powder and liquid), and manipulated on the block by mixing with a plastic spatula (Duflex ®, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The

mixture was inserted with an applicator syringe (Precision Maquira ®, Maringa, PR, Brazil) until the cavity was filled, followed by the “press finger” technique (30 s) with polyester tape (K-Dent Quimidrol ®, Joinville, SC, Brazil). The glass ionomer was allowed to set for 3 min, then protected with a layer of petroleum jelly (Rioquímica®, São José do Rio Preto, SP, Brasil) in accordance with the instructions of the manufacturer. Following restoration, the teeth were stored in a humidifier for 24 h at 37°C.

Topical application of CPP-ACP paste

Topical application of CPP-ACP paste was carried out only for G1CPP-ACP and G2CPP-ACP (Figure 1). For these groups, after the application of the Ketac liquid and before the restoration, a pretreatment with CPP-ACP paste was applied on the dentin for 1 min with the aid of a cotton ball, and the volume to each cavity was standardized with a cotton ball. The excess solution was removed with filter paper discs.

Before the restorative procedures, all the cavities received a layer of nail varnish on the mesial side of the cavity. The research design stipulated the division of the cavity into two sites: control area (NC) and test area (C). This was done to guarantee that the GIC would not be in contact with the dentin, as well as to make sure that the CPP-ACP paste solution would be the only chemical element in contact with the dentin.

Preparation of specimens for tests

The teeth were fixed in a cutting machine (Isomet ® 1000 Precision Saw Buehler, Lake Bluff, IL, USA) and were sectioned vertically with a diamond disk (1.3 mm Precision Saw, Lake Bluff IL ®, USA) at 300 rpm to obtain dental slices (n=3) with approximately 1.1 mm thickness.

Two dental slices were mounted in the center of PVC (Tiger®, Joinville, SC, Brazil) cylinders (12x20 mm), which were attached with double-sided tape (3M®, SUMARE, SP, Brazil) on a glass plate. The cylinders were filled with colorless acrylic resin (JET®, Clear Field, SP, Brazil) made by the powder and liquid technique

The embedded slices were taken to the rotary polishing machine (Arotec®, Cotia, SP, Brazil) to perform the polishing of specimens. A sequence of silicon carbide sandpapers (3M® Brazil, Sumaré, SP, Brazil) was used under intense water irrigation. Final polishing was performed with diamond paste (Arotec®, Cotia, SP, Brazil) of grain 1/4 µm. For removal of waste, the specimens were washed for 12 min in an ultrasonic tank. Finally, they were stored at 37°C for 24 h in a 100% humidity environment.

Microhardness Test

The microhardness analysis was performed on a microhardness apparatus (Shimadzu®, Kyoto, Japan) with a Knoop indenter. For 30s, the applied loads were 25g for sound dentin and 10g for demineralized dentin¹⁰.

The loads were applied on the specimens 50 µm below the cavity floor. Three different measures were made at 100 µm distance from each other at the same depth. The mean between these three measures was considered the microhardness value of the specimen.

Ions evaluation dentine by energy dispersive spectroscopy (EDS) and scanning electron microscope for field effect (FEG)

EDS (Shimadzu Model SSX 550®, Kyoto, Japan) coupled to SEM quantitatively evaluates the ion exchange between GIC and dentin. Five dental slices

from each group for evaluation were separated. Specimens previously selected were bonded on metal stubs with a cyanoacrylate ester layer (Pegamil bondgel ultra strong, Sao Jose, SC, Brazil) with the aid of microbrush. After the specimens were stored for 48 h for drying.

The reading was performed at 50 micron depth of the cavity base with 5000 x magnification. The areas were divided into areas of contact (C) and without contact (SC) of the restorative material to the dentin. Since it is possible to obtain two types of analysis: EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) and EBSD (Electron Backscatter Diffraction), in which it obtained the chemical and morphological characterization.

Statistical Analysis

The distribution of normality was verified with D'Agostino & Pearson and Shapiro Wilks tests; homogeneity of variances was tested with Levene's test. The hardness and EDS data were analyzed using ANOVA 2 criteria considering the factors dentin (sound and demineralized), treatment (with and without CPP-ACP) and treating dentin interaction. The level of significance used was 5% ($\alpha = 0.05$). The data FEG were analyzed qualitatively by groups. The statistical program GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA) was used for data analysis of hardness.

RESULTS

There was a significant difference in hardness values on treatment with MiPaste™ areas SC and C ($p < 0.0001$). Significant difference for dentin factor was

found in areas SC ($p < 0.0001$) and C ($p < 0.0001$). Interaction dentin and treatment SC ($p = 0.203$) and C ($p = 0.166$) there was no significant difference.

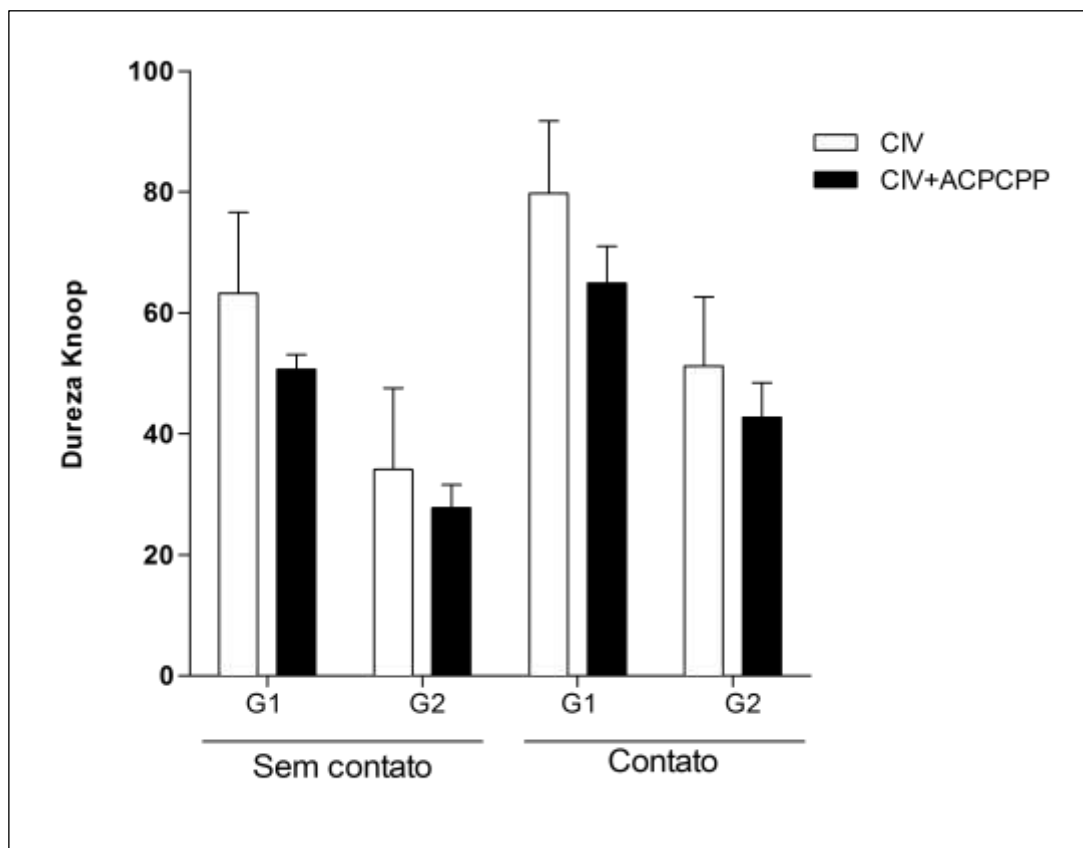


Figure 3 - Mean and standard deviation of Knoop hardness values obtained in sound dentin (G1) and demineralized (G2), with and without treatment using CPP- ACP in areas without (SC) and contact (C) of the restorative material (GIC) . (*) Significant difference in hardness values on treatment with MiPaste™ nas areas SC and C ($p < 0.0001$). (*) Significant difference to dentin factor in SC ($p < 0.0001$) and C ($p < 0.0001$). Interaction (factor dentin and treatment) no significant difference according SC area ($p = 0.203$) and C ($p = 0.166$). ANOVA with two criteria and Bonferroni post-test.

The EDS mineral assessment obtained percentage of Ca, P and F ions. In SC areas: significant difference was found in P values ($p = 0.0001$). Regarding the types of dentin ($p = 0.218$), treatment ($p = 0.077$) and interactions ($p > 0.05$) no significant differences. In Contact areas: there was no significant difference between treatments ($p = 0.865$) and interactions ($p > 0.05$). A significant difference between the types of dentin ($p = 0.027$) and minerals ($p < 0.0001$) were obtained. The ionic exchange between GIC and pretreated dentine with the CPP-ACP paste promoted significant changes in the mineral phosphorus.

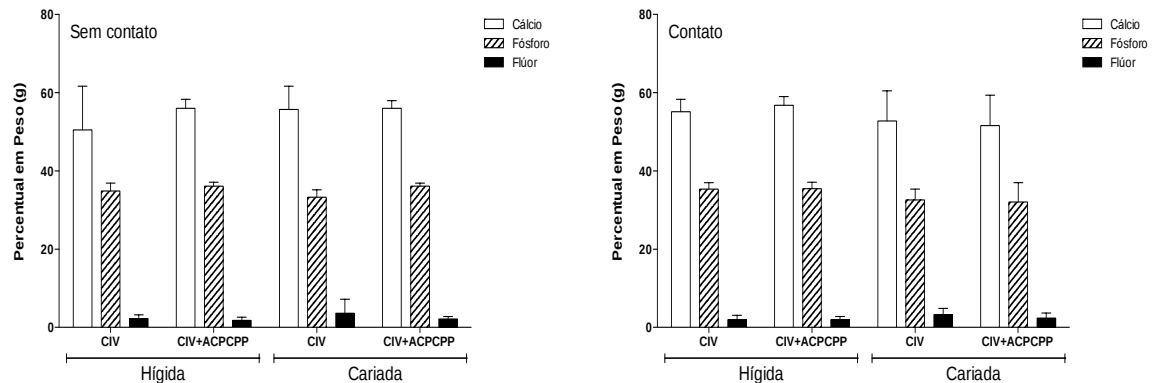


Figure 4 - Mean and standard deviation of the percentage by weight (g) of the minerals calcium, phosphorus and fluoride in sound and demineralised dentine with and without contact with the glass ionomer material (GIC) and ionomer + bioavailable casein-phosphate paste (CIV + CPP-ACP). No contact area: non-significant differences between the types of dentin ($p = 0.218$), treatment ($p = 0.077$) and interactions ($p > 0.05$); Significant difference between minerals ($p < 0.0001$). Contact: non-significant difference between treatments ($p = 0.865$) and interactions ($p > 0.05$); A significant difference between the types of dentin ($p = 0.027$) and minerals ($p < 0.0001$). ANOVA with two criteria and Bonferroni post-test.

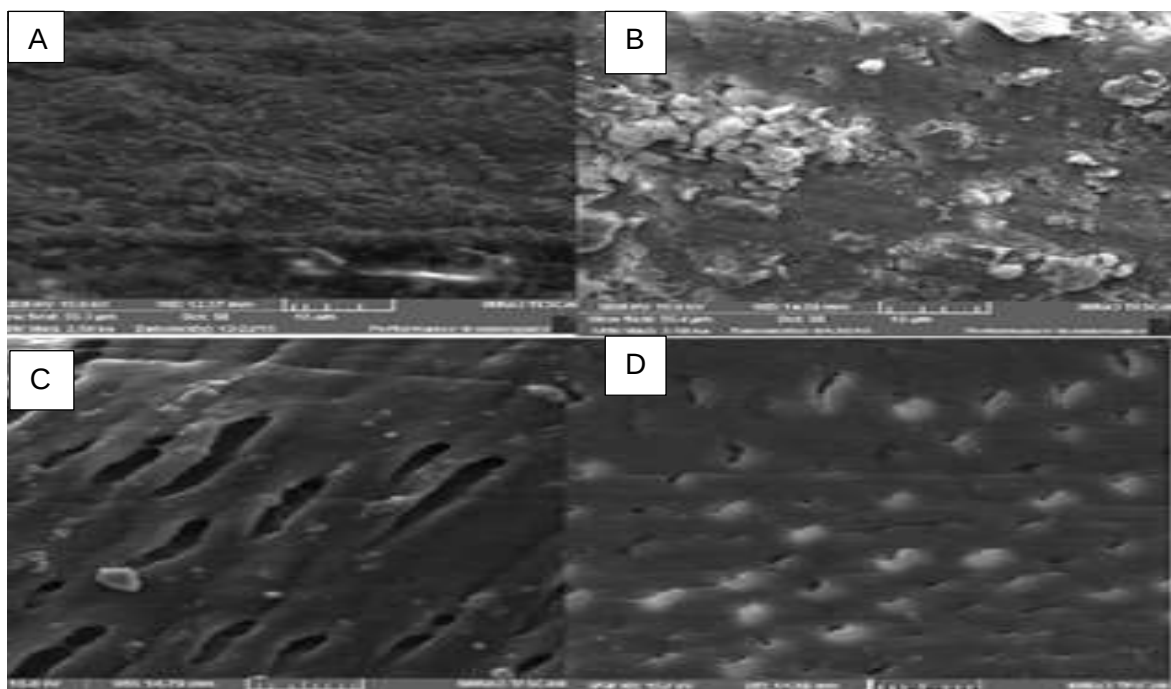


Figure 5 - Images from FEG. In (A): Sound dentine treated with CPP-ACP and GIC. In (B): Sound dentine. In (C) demineralised dentine treated with CPP-ACP/GIC and (D): Demineralised dentine without treatment.

The dentin images obtained in sound and demineralised dentine treated with CPP-ACP and GIC obtained from the FEG. Note the regular mineral deposits in

the dentin treated with CPP-ACP and obliteration of the dentinal tubeles from the treatment (A, C). In B, note the presence of surface irregularities sound dentin with the direct placement of GIC. The demineralised dentin surface carious without adhesion of the restorative material with open dentinal tubules (D).

DISCUSSION

Despite the advance of dental care in the few decades, the Knowledge of the physical and mechanical properties of the dental tissue allows relating the clinical behavior of restorations, dental caries still affect many children. Among the physical and mechanical properties, most relevant are the modulus of elasticity, resistance and hardness^{11,12,13}. For this experiment primary teeth were used. The specific treatment assessment for deciduous dentin, either by clinical and therapeutic differences of dentin surface, compared to dentin of the teeth permententes can potentially affect clinical practice¹⁴. The chemical composition of primary tooth differs from permanent tooth, which are observed in lesser thickness compared to enamel and dentin of permentente teeth^{13,14,15}. The percentage of Ca and P is found in lesser amounts in the primary teeth when compared to teeth permententes.^{15,16}

To assess the mineral content of the dental hard tissue, different methods can be used, such as energy dispersive spectrometer (EDS), wavelength fluorescence scatter X-rays spectroscopy (EDXRF), atomic absorption spectrophotometer (AAS) and FT-Raman^{16,17}. However, the techniques used in these studies (EDS and FEG) can be seen multiple elements at the same time^{16,17,18}. The method used to assess the changes in dentin was the EDS and FEG, which allows a record of the concentration of calcium, phosphorus and fluorine ions in the dentin surface treated by a microstructural and morphological analysis^{17,18}. Through EDS analysis it was concluded that there was significant improvement in the mineral properties of dentin, especially phosphorus ion, both in sound and demineralised dentin treated with Mi Paste combined with GIC. For Kim et al. (2010)¹⁹, the remineralization studies based on mineral uptake is insufficient to evaluate the success of contemporary strategies of remineralization. The present study examined the quantification or capture of ions

after 24 hours, with the purpose of electroless deposition which enables the improvement of mechanical properties at the interface, which favors a lower degradation then favors the clinical performance of restorations. Although it could preview the validity of proposal. So we still used this kind of methodology.

Dentin consists of organic and inorganic components; the primary inorganic component of the dental hard tissue are calcium (Ca) and phosphorus (P) presents in hidroxyapatite crystals²⁰. It has been reported that the Ca / P ratio of dentin depends on factors such as hidroxyapatite crystal type, availability, Ca, anatomical location²¹⁻²³. Moreover, it has been reported that changing the Ca / P ratio in the dentin can change the morphology of the dentin and affect the adhesion of restorative dental materials^{24,25,26}. According to results of this study, the relations Ca / P in dentin of deciduous teeth were affected by pretreatment with Mi Paste. The results showed that pre-treatment with Mi Paste validated mineral alteration of EDS, where we obtained the percentage of Ca, P and F ions. It was observed the ion exchange between Mi Paste and dental tissue, combined with presence of GIC and that statistically significant values were found for the ion P. However, the instability of the ions in colloidal suspension in the folder can come from a limited development to promote the full remineralization of carious lesions that can pass on statistically significant mineral values. Despite the instability, and non-significant differences, the reactivity of the CPP-ACP should be further explored in relation to accession and bioactivity. In addition, the improvement of absorption properties with effect on mechanical and chemical properties of the treated tissue.

Comparative analysis of the mechanical properties of the dentin indicates that the central area of the coronal sound dentin has a higher hardness than in the permanent that decidous, wich values in deciduous teeth have more than 34 KHN¹⁰. In several studies microhardness, it is observed that the enamel has higher values than dentin^{25,26}. Its weight is composed of approximately 70% minerals, 18% organic material and 12% of água^{15,20}. There is great difficulty in comparing microhardness dentine values between different studies. This is due to the use of various types of tests to determine that property (Mahoney et al., 2000).

Mineral loss or gain in dentin can be measured by spectroscopy and hardness tests^{18,26}. By integrating mechanical and chemical values of dentin, can obtain

information bearing on the longevity of conservative treatments. Work and research has shown there are few publications using deciduous teeth. The results showed that pre-treatment with Mi Paste validated change of hardness values due to significant difference found in the contact areas and without contact with MiPaste™. From this result, you can meet the application of CPP-ACP paste could promote a decay preventive effect, increasing remineralization and demineralization decrease the susceptibility of dentin^{5-7, 16}. Despite the instability and non-significant differences found the reactivity of the CPP-ACP, it should be better explored.

Simulate in vitro dynamics of carious lesions has been the method used in the experiments that evaluate the materials that will be in contact with the dentin cariada^{10,27}. The demineralized dentin was obtained by artificial caries lesions created by pH cycling method^{10,28} in an attempt to simulate the dynamics of the associated saturation mineral pH range of natural caries formation process. This laboratory method is considered appropriate to assess the loss and gain of mineral substrate^{10,18,29}. Marquezan et al. (2009)¹⁰ found in specimens mineral loss with significant reduction of hardness, reaching almost half of the value of sound dentin (34KHN). Some studies evaluated the levels of ion exchange between dentin and restorative material, through artificial caries lesions, and concluded that the in vitro method allows detailed studies of the interactions between restorative materials and dentin demineralised^{4,24}. The conditions used in artificial caries lesions follows a similar pattern to simulate in vivo conditions. That is, the lesion artificial caries has a surface layer rich in mineral intact and subsurface layer and low in mineral content. The approaching the in vitro findings to in vivo clinical situations.

The CPP-ACP provides all the elements needed for the remineralization of tooth surface and biofilm²⁴. This provides soluble calcium, fluoride and phosphate to promote remineralization with fluorapatite, which is more resistant to an etching future. The CPP can bind to calcium ions^{25, 15} phosphate ions and⁵ fluoride ions and can stabilize the calcium phosphate³⁰. However, the CPP-ACP is considered as a remineralizing agent wherein the anticariogenic effect of the CPP-ACP is by suppressing the demineralization, remineralization improvement or a combination of both. The presence of CPP-ACP may allow a rapid return of the calcium concentration and allow remineralização^{31,32,33}.

However, the literature has several studies showing the interaction with enamel^{34,35}, with few studies that evaluate the remineralization in the substrate deciduous dentin^{36,37}. The presence of CPP-ACP on the surface of the dentin caused a decrease in demineralization and remineralization in an increase in comparison with dentin surfaces without this agent³⁸. This suggests that the nanocomplexes formed with the CPP-ACP could promote the protection of the adjacent tooth tissue to pH changes, by reducing demineralization and help the remineralization of the tooth, which led some researchers to incorporate this material in dental products as the GIC^{39,40}. In the study of Mazzoui et al. (2003)³⁹ was observed a significant increase of microtensile bond strength and compressive strength, and a significant increase in the release of phosphate ions, calcium and fluoride in neutral and acid pH. Research has shown that the release of inorganic phosphate from the CPP-ACP, and fluoride sample containing CPP-ACP/GIC promoted greater protection of the adjacent dentin during acid challenge.

The use of GIC as restorative material is based on its properties biologically favorable to the release of fluoride and clinical performance⁴⁰. Some studies have shown that calcium ions, phosphorus and fluorine are released from the GICs restorations in enamel and dentin, particularly in demineralised dentin^{24,37}. Therefore, the results reinforced the importance of GIC as a material of choice for minimally invasive restorations.

Casein can provide a reservoir of ions during cariogenic attack^{38,41,42}, by the maintenance of the free ions of calcium and phosphate supersaturation state to the substrate, decrease and increase 36 demineralization, which results in a fabric more resistant to acid attacks³⁶. The caries prevention strategies have been based on the application of substances directly into dentine, as CPP-ACP, proposed to increase the dentine resistance cariogenic attacks. The CPP-ACP good clinical acceptance because of the ACP's ability to release calcium and phosphate ions in the oral environment acid, so that the ions can promote the remineralization of dental tissue tratado^{43,44,45}. The CPP-ACP nanocomplexes have anticariogenic activity demonstrated in vitro and in vivo^{33,43,45}, when employed in paste (MI paste, GC Corporation, Tokyo, Japa) may reduce demineralization and remineralization increase dentina^{5,6,7 32}

The application of Mi Paste dentin before application of the GIC, the filling of the cavity showed mineral gain phosphorus ion. However, the instability of ions in colloidal suspension in the slurry may result from a limited developing promote complete remineralization of carious lesions, which could pass on dentin hardness values statistically significant. Despite the instability and non-significant differences, the reactivity of the CPP-ACP should be further explored in relation to accession and bioactivity. In addition, the improvement of absorption properties with effect on mechanical and chemical properties of the treated tissue.

CONCLUSION

We conclude that pretreatment with topical paste bioavailable calcium and phosphate was effective in changing the properties minerals, especially phosphorus ion in both sound as demineralized dentin. More tests in vitro and in vivo have to be employed to evaluate the longevity and stability of the mineral gain described in this study.

REFERENCES

1. American Academy of Pediatric Dentistry. Reference manual: guidelines on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. *Pediatr. Dent.* 2010;(31):179-86
2. Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent. Mater.* 2002; 18: 543-51.
3. Pashley DH; Pashley EL; Carvalho RM; Tay FR. The effects of dentin permeability on restorative dentistry. *Dent Clin North Am* 2002; 46(2): 211-45.
4. Ngo HC; Mount, G.; McIntyre, J.; DO, L. An in vitro model for the study of chemical exchange between glass ionomer restorations and partially demineralized dentin using a minimally invasive restorative technique. *J Dent.*, v.39, n. Suppl 2, p. 20-6, 2011
5. Zhang, Q.; Zou, J.;Yang, R. &Zhaou, X. Remineralization effects of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate crème on artificial early enamel lesions of primary teeth. *Internantional Journal of Paediatric Dentistry* 2011; 21: 374-381

6. Llena, C.; Forner, L.; Baca, P.. Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a review of the literature. *Journal Contemp Dent Pract.*, v. 3, n. 10, p. 1-9, 2009.
7. Nesser JR, Golliard M, Woltz A et al. In vitro modulation of oral bacterial adhesion to saliva coated hydroxyapatite beads by milk casein derivatives. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 193-201
8. Srinivasan N, Kavitha M, Loganathan SC. Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 ppm fluoride on eroded human enamel: an in situ study. *Arch Oral Biol* 2010; 55: 541-544
9. Adebayo, O. A.; Burrow, M. F.; Tyas, M. J. Dentine bonding after CPP-ACP paste treatment with and without conditioning. *Journal of Dentistry*, v. 36, p. 1013-102, 2008
10. Marquezan, M.; Correa, F. N. P.; Sanabe, M. E.; Rodrigues Filho, L. E.; Hebling, J.; Guedes-Pinto, A. C.; Mendes, F. M. Artificial methods of dentine caries induction: a hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol.*, v.54, n.12, p.1111-117, 2009
11. Galo R, Contente MM, Bosatto MC. Wear of two pit and fissure sealants in contact with primary teeth. *Eur J Dent* 2014; 8: 241-8
12. Xu HH, Smith DT, Jananimir S, Romberg E, Kelly JT, Thompson VP, et al. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin . *J Dent Res* 1998; 77: 471-80
13. Mahoney E, Holt A, Swain M, Kilpatrick N. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: An ultra-micro-indentation study. *J Dent* 2000; 28: 589-94
14. Osório R. et al. Primary dentin etching time, bond strength and ultra-structure characterization of dentin surfaces. *Journal of Dentistry* 2010.(38): 222-13
15. Gouler C, Malkoc MA, Gorgen VQ, Dilber E, Bulbul M. Effects of Er: YAG Laser on Mineral Content of Sound Dentin in Primary Teeth. *The Scientific World Journal*.2014:1-6
16. Tsuda, H.; Ruben J.; Arends, J. Raman spectra of human dentin mineral. *Eur J Oral Sci.*, v.104, n.2, p.123-31, 1996
17. Sauro, S.; Thompson, I.; Watson, T. F. Effects of common dental materials used in preventive or operative dentistry on dentin permeability and remineralization. *Oper Dent.*, v. 36, n.2, p.222-30, 2011
18. Diamanti, I.; Koletsi-kounari, H.; Mamai-homata, E.; Vougiouklakis, G. In vitro evaluation of fluoride and calcium sodium phosphosilicate toothpastes, on root dentine caries lesions. *J Dent.*, v.39, n.9, p.619-28, 2011

19. Kim, Y. K.; Yiu, C. K.; Kim J. R.; Gu, L.; Kim S. K.; Weller, R. N.; Pashley D. H.; TAY, F. R. Failure of a glass ionomer to remineralize apatite-depleted dentin. *J Dent Res.*, v. 89, n.3, p.230-5, 2010
20. De Menezes Oliveira MA¹, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth *Microsc Res Tech.* 2010 May;73(5):572-7
21. Rose RK. Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch Oral Biol.* 2000;45(7): 569-575
22. Azarpazhooh A, Limeback H. Clinical efficacy of casein derivatives: A systematic review of the literature. *J Am Dent Associ.* 2008: 139 (7): 915-924
23. Kumar VLN, Ittagarun A, King NM. The effect of casin phosphopeptide-amourphous calcium phosphate on remineralization of articial caries-like lseions: an in vitro study. *Aust Dent J.* 2008.53 (1): 34-40
24. Bezerra, A. C.; Novaes, R. C.; Faber, J.; Frencken, J.E.; Leal, S. C. Ion concentration adjacent to glass-ionomer restorations in primary molars. *Dent Mater.*, v.28, n.11, p.259-63, 2012
25. S Zhang, T Chen and L, Ge. " Scanning electron microscopy study of cavity preparation in deciduous teeth using the Er: YAG laser with different powers. *Laser in Medical Science* 2012. 27 (1): 141-144
26. Malkoc MA, Sevimay M. Evaluation onf mineral content of dentin treated with desensitizing agents and neodymium yttrium-aluminium-garnet (Nd: YAG) laser. *Laser in Medical Science* 2012. 23 (4): 743-748
27. Todd, M. A.; STaley, R. N.; Kanellis, M. J.; Donly, K. J.; Wefel, J. S. Effect of a fluoride varnish on demineralization adjacent to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999. 116(2): 159-67
28. Ten cate, J. M.; Duijster, P. P. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Research* 1982. 16:201-10
29. Diamanti, I.; Koletsi-kounari, H.; Mamai-homata, E.; Vougiouklakis, G. In vitro evaluation of fluoride and calcium sodium phosphosilicate toothpastes, on root dentine caries lesions. *J Dent* 2011. 39(9): 619-25
30. Vitorino, R.; Lobo, M. J.; Duarte, J. R.; Ferrer-correia, A. J.; Domingues, P. M.; Amado, F. M. The role of salivary peptides in dental caries. *Biomed Chromatogr* 2005. 19(3):214-222
31. Cross, K. J.; Huq, N. L.; Palamara, J. E.; Perich, J. W.; Reynolds, E. C. Physiochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *J Biol Chem* 2005.28: 15362-69

32. Reynolds, E. C. Anticariogenic complexes of amorphous phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Special Care in Dentistry* 1998.18(1):8-16
33. Oshiro, M.; Yamaguchi K.; Takamizawa T.; Inage H.; Watanabe T.; Irokawa A.; Ando S.; Miyazaki M. Effect of CPP-ACP paste on tooth mineralization: an FE-SEM study. *Journal of Oral Science* 2007. 49(2):115-20
34. Iijima, Y.; Cai, F.; Shen, P.; Walker, G.; Reynolds, C.; Reynolds, E.C. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralizes by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res* 2004. 38(6):551-56
35. Pulido, M. T.; Wefel, J. S.; Hernandez, M. M.; Denehy, G. E.; Guzman-Armstrong, S.; Chalmers, J. M.; Qian, F. The inhibitory effect of MI paste, fluoride and a combination of both on the progression of artificial caries-like lesions in enamel. *Oper Dent* 2008.33:550-55.
36. Yamaguchi, K.; Miyazaki, M.; Takamizawa, T.; Inage, H.; Kurokawa, H. Ultrasonic determination of the effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste of the demineralization of bovine dentin. *Caries Res* 2007.41(3):204-207
37. Dias, GF; Chibinski ACR; Santos, FA, Hass V. Alves, FBT; Wambier DS. The hardness and chemical changes in demineralized primary dentin treated by fluoride and glass ionomer cements. *Rev Odontol UNESP*. 2014 Jan-Feb; 45 (1): 33-40
38. Rahiotis, C.; Vougiouklakis G. Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine in vitro. *Journal of Dentistry* 2007. 35(8):695-98.
39. Mazzaoui, S. A.; Burrow, M. F.; Tyas, M. J.; Dashper S. G.; Reynolds, E. C. Incorporation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate into a glass-ionomer cement. *J Dent Res* 2003. 82(11):914-8
40. Ferrazzano GF, Amato I, Cntile T, et al. In vivo remineralising effect of GC Tooth mousse on early dental enamel lesions: SEM analysis. *Int Dent J*. 2011; 24 (2): 119-123.
41. Langhorst SE, O'Donnell JNR, Skrtic D. In vitro remineralization of enamel by polymeric amorphous calcium phosphate composite: quantitative microradiographic study. *Dent Mater* 2009; 25: 884-91
42. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphate: the contention of bone. *J Dent Research* 1997; 76: 1433-6
43. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kibalczyk W, Andersen FA. A contribution to the understanding of the formation of calcium phosphates. *J Cryst Growth* 1989; 94: 767-77

44. Erdem AP, Sepet E, Ashalom T, et al. Effect of CPP-ACP and APF on *Streptococcus mutans* biofilm: A laboratory study. *Am J Dent* 2011; 24(2): 119-123
45. Ranjitkar S, Rodriguez JM, Kaidonis JA et al. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. *J Dent*. 2009; 37 (4): 250-254

5. DISCUSSÃO

A tentativa de simular *in vitro* a dinâmica da lesão de cárie tem sido o método adotado nos experimentos direcionados aos materiais que estão em contato com a dentina cariada (Toledano et al., 2014⁹; Veis & Dorvee, 2013¹⁰). A dentina desmineralizada obtida por meio de lesão artificial de cárie criada pelo método de ciclagem de pH modificado (Tood et al., 1999¹³, Marquezan et al., 2009¹⁴), tenta simular a dinâmica da saturação mineral associada à variação de pH do processo de formação de cárie natural. O método laboratorial de ciclagem de pH utilizado neste estudo é considerado adequado para avaliar a perda mineral do substrato dentário (Seiramwan, 2012¹²; Ngo et al., 2011¹⁵; Marquezan et al. 2009¹⁴), pois a expressiva redução de dureza foi alcançado cerca da metade do valor da dentina hígida de dentes decíduos (34 KHN). Estudos que avaliaram valores de trocas iônicas entre dentina e material restaurador, por meio de lesões artificiais de cárie, concluíram que o método *in vitro* permite estudos detalhados das interações entre material restaurador e dentina desmineralizada (Ngo et al., 2011¹⁵ ; Toledano et al., 2014⁹), como o empregado no presente estudo. Os valores médios dureza dentinária de dentes decíduos obtidos na dentina decídua íntegra, variam entre 50 a 70 KHN, sendo os valores médios na dentina desmineralizada em torno de 30 KHN (Marquezan et al., 2009¹⁴). Os resultados desta pesquisa revelaram que a dentina desmineralizada (G2) foi o substrato mais reativo em ambos os materiais utilizados, devido ao maior impacto percentual de íons aliado ao incremento de valores de dureza, tanto em áreas de SC como C. O incremento dos valores de dureza significativamente ocorreu para a DMT (Stark e Meier, 2000)¹⁸ independente da associação com CIV. Em relação ao CPP-ACP, considerado depositador de minerais em dentina remanescente, houve incremento das propriedades químicas do substrato dentinário com a deposição significativa de íons Fósforo somado ao incremento das propriedades mecânicas (Sauro et al., 2011¹⁶ ; Bezerra et al., 2012¹⁷ ; Zavgorodniy et al., 2008¹⁹) validado por valores de dureza significativos em áreas SC e C .

A remoção parcial de tecido cariado tem sido usualmente empregada por odontopediatras (Frazon et al., 2007²⁰), devido ao risco de exposição pulpar decorrente da anatomia dos dentes deciduos, em que a TPI (tratamento pulpar

indireto) surge como alternativa clínica às situações de risco. O TPI é considerado tratamento alternativo para pulpotomia no tratamento de cárie profunda sem sinais de degeneração pulpar (Frazon et al., 2007²⁰; Marchi et al, 2008²¹). Sendo evidenciado pela aplicação de substâncias no remanescente dentinário desmineralizado, decisiva para o sucesso do TPI, desde que a técnica seja considerada substância-dependentes (Sauro et al., 2011¹⁶; Guglielmi et al., 2011²⁸; Zavgorodniy et al., 2008¹⁹; Zavgorodniy et al., 2009²⁹; Ricketts et al, 2006³⁰). Diante da situação clínica com risco de exposição pulpar na remoção de dentina cariada, o TPI protege e impede a progressão da lesão de cárie subjacente, desde que seja realizado em condições adequadas de isolamento absoluto, executado em sessão única, seguido de restauração definitiva e controle clínico-radiográfico trimestral (Toledano, 2014⁹; Guglielmi et al., 2011²⁸).

No entanto, a busca por materiais que apresentem propriedades mecanoquímicas com capacidade de bloquear a microinfiltração, e consequentemente proteger a polpa dentária, são agentes potenciais para diminuir o risco de infiltração bacteriana e promover a longevidade da restauração. Em relação às substâncias protetoras, podem ser utilizadas: hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), agregado de trióxido mineral (MTA) e CIV (Falster et al., 2002²²; Frazon et al., 2007²⁰; Marchi et al, 2008²¹).

O hidróxido de cálcio tem sido mais comumente utilizado, no entanto, estudos *in vitro* têm apresentado resultados desfavoráveis relacionados às propriedades de alta solubilidade, baixa resistência à compressão e ausência de adesão ao substrato dentário (Frazon et al., 2007²⁰; Marchi et al, 2008²¹). Estudos demonstram que a efetividade clínica de substâncias em dentina residual após a remoção parcial de cárie (Marchi et al, 2008²¹; Falster et al., 2002²²; Duque et al., 2009²³) não apresentam diferenças significativas estatisticamente (Buyukgural et al., 2008²⁴; Ferreira et al., 2012²⁵; White, 1992²⁶). Frente aos resultados desfavoráveis de alguns materiais utilizados para o TPI, é que se propôs neste estudo o uso de materiais potenciais para o tratamento pulpar conservador como a DMT e o CPP-ACP. Em busca de propor alternativas de biomateriais com biocompatibilidade, ausência de respostas biológicas adversas e bioatividade na tentativa de remineralizar dentina por atividade biológica relacionado ao Ca e P.

No entanto, a busca por materiais que apresentem propriedades mecanoquímicas com capacidade de bloquear a microinfiltração, e

consequentemente proteger a polpa dentária, são agentes potenciais para diminuir o risco de infiltração bacteriana e promover a longevidade da restauração. Os materiais propostos neste estudo, com intuito promover trocas iônicas na interface da dentina remanescente e repercutir em propriedades químico-mecânicas. Tanto o CPP-ACP quanto a DMT, apresentaram a incorporação de íons minerais aliada à repercussão positiva em valores de dureza. O destaque foi para a DMT, pois isoladamente obteve melhor desempenho independente da associação ao CIV. O que foi também encontrado é que o pré- tratamento com CPP-ACP e DMT não afetou adversamente a morfologia dentinária, através das imagens do FEG. Ao se considerar o procedimento restaurador, o preparo da cavidade com a aplicação prévia dos materiais durante um minuto pode ser um procedimento facilmente aplicável por clínicos como um novo passo para procedimentos adesivos.

A evolução dos materiais odontológicos é ampla, com vistas a estimular a resposta adequada dos tecidos vivos por meio de reparo histológico, ao contribuir ao avanço e aumento das pesquisas por biomateriais. Sendo que, a busca por técnicas e aplicações simplificadas devem estar ao alcance do Odontopediatra. Além de perspectivas futuras, novos estudos devem ser empregados com base nos resultados já encontrados, com a finalidade de validar o uso clínico dos materiais DMT e CPP-ACP. O pré-tratamento com DMT e CPP-ACP deve ser suportado por mais estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a durabilidade da técnica descrita. Em que a indicação destes novos materiais seja embasado em diversas situações clínicas, em consideração aos critérios clínicos e éticos, quanto ao risco e benefícios do tratamento.

6. CONCLUSÃO

A DMT é atóxica, capaz de liberar quantidade considerável de cálcio, pH alcalino e com fases cristalinas que fazem dos materiais promissores para o uso odontológico. Ao simular *in vitro* a aplicação da DMT como material odontológico, foi considerada como alternativa na remineralização dentinária em dentes decíduos, devido às alterações das propriedades químicas e mecânicas da dentina decídua desmineralizada independente da associação com CIV. A

aplicação prévia de CPP-ACP, como agente coadjuvante ao CIV, alterou significativamente a quantidade de íons fósforo com repercussão de ganho mineral na dentina decídua desmineralizada remanescente. Este estudo suporta a hipótese de ambos os materiais apresentarem uso potencial para o tratamento pulpar indireto.

REFERÊNCIAS

1. Duque C, Negrini TC, Sacono NT, Spolidorio DMP, Cosata CAS, Hebling J. Clinical and microbiological performance of resin-modified glass ionomer liners after incomplete caries removal. *Clin Oral Invest* 2009;13:465-471.

2. Ricketts DNF, Kidd EAM, Innes N, Clarkson J. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;19:38-33.

3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais/ Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 116p.:il.

4. Fuks A, Kupietzki A, Guelmann M. Pulp therapy for the primary dentition. In; *Pediatric Dentistry: infancy through adolescen.* 2013;333.

5. Pinheiro LP, Santos MMP, Rondino AF, Imparato JCP. Capeamento pulpar indireto em Odontopediatria: indicações e possibilidades. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2003; 57(4): 280-3.

6. Uusoy at, Bayrak B, Bodrumlu EH. Clinical and radiological evaluation of calcium sulfate as direct pulp capping material in primary teeth. *Eur J Paediatr Dent Off J Eur Acad Paediatr Dent* 2014;15:127-31.

7. Marghalani AA, Omar S, Chen JW. Clinical and radiographic success of mineral trioxide aggregate compared with formocresol as a pulpotomy treatment in primary molars: a systematic review and meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 2014;145:714-21.

8. Ngo, H. C.; Mount, G.; McIntye, Tuisuva J, Von Doussa RJ. Chemical exchange between glass-ionomer restorations and residual carious dentine in permanent molars: an in vivo study. *J Dent* 2006 Sep;34(8):608-13

9. Toledano, M, Cabello I, Vilchez MAC, Fernandez MA, Osorio R. Surface Microanalysis and chemical Imaging of Early Dentin Remineralization. *Microsc. Microana,* 2014;20:245-256.

10. Veis A & Dorvee, JR. Biomineralization mechanisms: A new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcif Tissue Int* 2013; 93:307-315

11. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. Reference Manual 2014-2015. *Pediatr Dent* 2014; 36: 242-50.

12. Seirawan H, Faust S, Mulligan R. The impact of oral health on the academic performance of disadvantaged children. *Am J Public Health*.2012;102:1729-34.

13. Todd, M. A.; Staley, R. N.; Kanellis, M. J.; Donly, K. J.; Wefel, J. S. Effect of a fluoride varnish on demineralization adjacent to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;116(2):159-67

14. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling AC Artificial methods of dentine caries induction: hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009 Dec;54(12):1111-7.

15. Ngo, H. C.; Mount, G.; McIntyre, J.; DO, L. An in vitro model for the study of chemical exchange between glass ionomer restorations and partially demineralized dentin using a minimally invasive restorative technique. *J Dent* 2011;39(2):20-6

16. Sauro S, Thompson I, Watson TF. Effects of common dental materials used in preventive or operative dentistry on dentin permeability and remineralization. *Oper Dent*. 2011 Mar-Apr;36(2):222-30.

17. Bezerra, A. C.; Novaes, R. C.; Faber, J.; Frencken, J.E.; Leal, S. C. Ion concentration adjacent to glass-ionomer restorations in primary molars. *Dent Mater* 2012;28(11):259-63

18. Stark, K.; Meier, W. Prevenções e cura com pedras: a mais pura energia. 2. ed. Rio de Janeiro: Robafim 2002:57-58

19. Zavgorodniy, AV et al. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol* 2008;53(2):124-32

20. Frazon R, Casagrande L, Pinto AS, Garcia –Godoy F, Matz M, Araujo FB. Clinical and radiographic evaluation of indirect pulp treatment in primary molars: 36 months follow-up. *Am J Dent* 2007; 20:189-192
21. Marchi JJ, Froner AM, Alves HLR, Bergmann CP, Araújo FB. Analysis of primary tooth dentin after indirect pulp capping. *J Dent Child* 2008;75:295-300
22. Gugliemi CA, Raggio DP, Takeuti ML, Camargo LB, Imparato JC. Fluoride release and uptake of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment. *Pesq. Bras. Odontoped Clin Integr* 2011;11(4): 561-5
23. Zavgorodniy, AV et al. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol.* 2009; 53 (2): 124-32
24. Ricketts DNJ, Kidd EAM, Innes N, Clarkson J. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 19: CDC003808.
25. Falster CA, Araujo FB, Straffon LH, Nor JE. Indirect pulp treatment: in vivo outcomes of an adhesive resin system vs calcium hydroxide for protection of the dentin-pulp complex. *Pediatr Dent* 2002;24: 241-248
26. Duque C, Negrini TC, Sacono NT, Spolidorio DMP, Costa CAS, Hebling J. Clinical and microbiological performance of resin-modified glass ionomer liners after incomplete dentine caries removal. *Clin Oral Invest* 2009; 13:465-471
27. Buyukgural B, Cehreli ZC. Effect of different adhesive protocols vs calcium hydroxide on primary tooth pulp with different remaining dentin thicknesses: 24-month results. *Clin Oral Invest* 2008; 12: 91-96
28. Ferreira JMS, Pinheiro SL, Sampaio FC, Menezes VC. Caries removal in primary teeth: A systematic review. *Quintessence Int* 2012; 43:9-15
29. White, D. J. The comparative sensitivity of intra-oral, in vitro, and animal models in the 'profile' evaluation of topical fluorides. *J Dent Res* 1992; 71:884-94

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da dolomita, diamino fluoreto de prata e da caseína fosfoptídea fosfato de cálcio amorfo, na dentina decídua desmineralizada selada com cimento de ionômero de vidro

Pesquisador: Gisele Fernandes Dias

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56509216.0.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.565.693

Apresentação do Projeto:

Avaliar in vitro a permuta química e suas repercussões químico-mecânicas em dentina decídua parcialmente desmineralizada, sob a ação de pré-tratamento com os materiais (DMT, DMFP e ACP-CPP), seguido de CIV, através da Dureza Knoop, EDS, Espectroscopia de Micro Raman e FEG

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar in vitro a permuta química e suas repercussões químico-mecânicas em dentina decídua parcialmente desmineralizada, sob a ação de pré-tratamento com os materiais (DMT, DMFP e ACP-CPP), seguido de CIV, através da Dureza Knoop, EDS, Espectroscopia de Micro Raman e FEG

Objetivo Secundário:

Quantificar alterações em dureza da dentina decídua hígida e desmineralizada, após contato com CIV e os produtos em teste. Quantificar alterações minerais em relação ao conteúdo de flúor, cálcio e fósforo envolvidos nas trocas iônicas entre CIV e substrato dentinário hígido e desmineralizados, com os produtos em teste. Comparar o conteúdo de flúor, cálcio e fósforo envolvidos nas trocas

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvararanas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

Continuação do Parecer: 1.565.693

iônicas entre CIV e substrato dentinário decíduo

hígido e desmineralizado com os produtos em teste, e suas repercussões nas propriedades químico-mecânicas em dentina decídua parcialmente

desmineralizada. Obter imagens relativas aos procedimentos efetuados em FEG para caracterizar aspectos morfológicos da cárie artificial e

tratamentos realizados para oferecer subsídios referentes aos Dados de outros testes

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos: serão evitados, pois os trabalhos serão realizados em laboratório e os procedimentos relativos ao corte de dentes serão conduzidos com uso

equipamento de proteção individual.

Benefícios:

Benefícios: uma melhor compreensão da importante dinâmica de trocas iônicas entre material restaurador e substrato dentário e suas repercussões

nas propriedades biomecânicas dentinárias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo possibilitará a compreensão da dinâmica de trocas iônicas entre material restaurador e substrato dentário, com possíveis repercussões nas

propriedades químico-mecânicas dentinárias a partir do tratamento prévio da dentina remanescente com os produtos em teste. Objetiva-se nesta pesquisa, avaliar as trocas minerais e repercussões nas propriedades mecânicas entre CIV e dentina decídua desmineralizada

selada submetida à aplicação tópica em dentina cariada de 3 tipos diferentes de materiais, capazes de alterar quimicamente a dentina decídua

desmineralizada remanescente, decorrente da realização de tratamento restaurador atraumático in vitro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em anexo

Recomendações:

Solicita-se informar a Propesp e a Coep o término de projeto de pesquisa via plataforma Brasil para evitar pendências após a finalização do mesmo.

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 1.565.693

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_726397.pdf	30/05/2016 13:04:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Tese2016.docx	30/05/2016 13:02:35	Gisele Fernandes Dias	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_2016.doc	30/05/2016 12:59:08	Gisele Fernandes Dias	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTA GROSSA, 30 de Maio de 2016

Assinado por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br