

**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO “PROF. JOSÉ DE SOUZA
HERDY”
UNIGRANRIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE ENXERTOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DA
MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA
– ANÁLISE MICROESTRUTURAL**

DISSERTAÇÃO

MARCIO BATISTA DO NASCIMENTO

2022

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO “PROF. JOSÉ DE SOUZA HERDY”
UNIGRANRIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE ENXERTOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DA
MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA – ANÁLISE
MICROESTRUTURAL

MÁRCIO BATISTA DO NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de concentração Implantodontia).

Orientador:
Prof. Dr. Fabiano Luiz Heggendorn

Co-orientador (a):
Dr. Alexandre Antunes Ribeiro

I

2022

DESENVOLVIMENTO DE ENXERTOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DA
MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA – ANÁLISE
MICROESTRUTURAL

MÁRCIO BATISTA DO NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, da Universidade do
Grande Rio (UNIGRANRIO),
como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em
Odontologia (Área de
concentração Implantodontia).

Aprovada em 27 de setembro de 2022

Banca examinadora

Prof. Dr. Fabiano Luiz Heggendorff
Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Dr. Alexandre Antunes Ribeiro
Instituto Nacional de Tecnologia do Rio de Janeiro - INT

Dr^a. Andreza Menezes Lima
Instituto Nacional de Tecnologia do Rio de Janeiro - INT

Prof.^a Dr^a. Danielle Dutra Voigt
Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus o autor e
consumador da minha fé, a minha querida esposa e aos
meus filhos amados, que comigo caminharam lado a lado
rumo a mais uma conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me condicionado a chegar até aqui, agradeço a minha família que em todo tempo me apoiou em todos os momentos, agradeço ao meu orientador Dr. Fabiano que foi muito mais que um orientador (Provérbios 17:17) “Em todo o tempo ama o amigo; e na angústia nasce o irmão”, agradeço ao meu coorientador Dr, Alexandre Antunes quem me abriu as portas no INT e tanto se dedicou para que esse dia chegasse, Dra. Andreza quem se dedicou e se dispôs a me orientar e ajudar dentro dos laboratórios do INT, agradeço a coordenação e professores do PPGO, agradeço a todos os colegas que contribuíram para o meu crescimento e desenvolvimento!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	01
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVO(S)	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
9. APÊNDICE	60

RESUMO

O objetivo deste estudo foi o de avaliar um protocolo metodológico com maior eficiência desmineralizadora para o tratamento químico de enxerto autógeno da matriz dentinária desmineralizada (DDM), padronizando a melhor metodologia a ser empregada para a produção da DDM. **Materiais e Métodos.** Foram utilizados 9 dentes, seccionados horizontalmente em discos de 3 a 4 mm de espessura, formando corpos de prova (CPs) originados da porção radicular e da porção coronária. Os CPs foram submetidos à limpeza ultrassônica e secagem em estufa por 1h a 100°C. Em seguida foi determinada a densidade pelo método Arquimedes de cada CP, quando imersos em água destilada. Posteriormente as amostras foram divididas em 5 grupos: G.Control: controle negativo, Água destilada (n = 3); G.EDTA: controle positivo, EDTA trissódico (n = 3); G.NaOCl: hipoclorito de sódio a 2,5% (n = 3); G.HCl-0,6M: ácido clorídrico 0,6M (n = 3) e G.H₂O₂/H₂SO₄: peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico (n = 3). Cada CP foi imerso em 5 ml, da solução descalcificadora correspondente de seu grupo, em frascos tipo penicilina de 10 ml em cuba ultrassônica contendo água destilada pré-aquecida a 60 °C, por 1h. Posteriormente foi determinada a perda de massa e a Densidade pelo método Arquimedes após a imersão dos CPs. Em última análise, dois CPs de cada grupo foi analisado em microscopia eletrônica de varredura e em microanálise elementar por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x (MEV-EDS). **Resultados.** A análise revelou uma maior perda de massa no G.HCl-0,6M. Já a diferença da determinação da densidade (ρ) e Densidade Relativa (DR) entre os grupos demonstrou uma redução da ρ e da DR maior nos grupos G.HCl-0,6M ($\rho = - 0,42 \pm 0,19 \text{ g/cm}^3$, DR = - 18,45 \pm 10,58 %), G.EDTA ($\rho = - 0,11 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$, DR = - 4,10 \pm 1,94 %), G.H₂O₂/H₂SO₄ ($\rho = - 0,08 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$, DR = - 3,10 \pm 1,65 %) e G.NaOCl ($\rho = - 0,03$

$\pm 0,04 \text{ g/cm}^3$, DR = - $1,31 \pm 1,55 \%$). A diferença de Porosidade (Poros.) também seguiu o mesmo padrão dos grupos acima, revelando um ganho de porosidade nos grupos G.HCl-0,6M (Poros. $18,45 \pm 10,58 \%$), G.EDTA (Poros. $4,10 \pm 1,94 \%$), G.H₂O₂/H₂SO₄ (Poros. $3,10 \pm 1,65 \%$) e G.NaOCl (Poros. $1,31 \pm 1,55 \%$). A análise no MEV revelou no G.HCl-0,6M e G.H₂O₂/H₂SO₄ imagens sugestivas de maior desmineralização quando comparado aos demais grupos. O G.H₂O₂/H₂SO₄ revelou uma intensa desmineralização na superfície, quando comparado aos demais grupos, revelando túbulos dentinários expostos, abaixo do nível da superfície dentinária, com desmineralização intertubular, se assemelhando a *scaffolds*. Análise no MEV-EDS evidenciou uma composição diversificada de O, C, P e Ca nos grupos G.H₂O₂/H₂SO₄ e G.HCl-0,6M. Conclusão. Através do emprego da determinação da densidade pelo método Arquimedes foi possível identificar o melhor potencial de desmineralização nas soluções de HCl-0,6M, H₂O₂/H₂SO₄ e EDTA, acarretando características de microporosidade mais adequadas em termos de profundidade dos microporos. O emprego da solução de G.H₂O₂/H₂SO₄ permitiu a formação de microporos interconectados, sugerindo melhores estruturas de poros para aplicação em *scaffolds*, quando comparadas com as demais soluções estudadas.

Palavras-chave: Arcabouço; enxerto autógeno e matriz dentinária desmineralizada.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate a methodological protocol with greater demineralizing efficiency for the chemical treatment of autogenous grafts of the demineralized dentin matrix (DDM), standardizing the best methodology to be used to produce DDM. Materials and methods. Nine teeth were used, horizontally sectioned into 3 to 4 mm thick discs, body of test (Bt) originating from the root portion and the coronal portion. The CPs were submitted to ultrasonic cleaning and drying in an oven for 1 h at 100 °C. Then, the density was determined by the Archimedes method of each Bt, when immersed in distilled water. Subsequently, the samples were divided into 5 groups: G.Control: negative control, distilled water (n = 3); G.EDTA: positive control, trisodium EDTA (n = 3); G.NaOCl: 2.5% sodium hypochlorite (n = 3); G.HCl-0.6M: 0.6M hydrochloric acid (n = 3) and G.H₂O₂/H₂SO₄: hydrogen peroxide and sulfuric acid (n = 3). Each Bt was immersed in 5 ml of the corresponding descaling solution of its group, in 10 ml penicillin flasks in an ultrasonic vat containing distilled water preheated to 60 °C for 1 h. Subsequently, the mass loss and Density were determined by the Archimedes method after the immersion of the Bts. Ultimately, two CPs from each group were analyzed in scanning electron microscopy and in elemental microanalysis by X-ray Energy Dispersive Spectrometry (SEM-EDS). Results. The analysis revealed a greater mass loss in G.HCl-0.6M. The difference in the determination of density (ρ) and Relative Density (RD) between the groups showed a greater reduction of ρ and DR in the G.HCl-0.6M groups ($\rho = - 0.42 \pm 0.19 \text{ g/ cm}^3$, DR = - 18.45 \pm 10.58 %), G.EDTA ($\rho = - 0.11 \pm 0.03 \text{ g/cm}^3$, DR = - 4.10 \pm 1.94 %), G.H₂O₂/ H₂SO₄ ($\rho = - 0.08 \pm 0.06 \text{ g/cm}^3$, DR = - 3.10 \pm 1.65 %) and G.NaOCl ($\rho = - 0.03 \pm 0.04 \text{ g/cm}^3$, DR = - 1.31 \pm 1.55 %). The difference in Porosity (Poros.) also followed the same pattern as the groups

above, revealing a gain in porosity in the groups G.HCl-0.6M (Poros. 18.45 ± 10.58 %), G.EDTA (Poros. 4.10 ± 1.94 %), G.H₂O₂/H₂SO₄ (Pores. 3.10 ± 1.65 %) and G.NaOCl (Pores. 1.31 ± 1.55 %). The SEM analysis revealed in G.HCl-0.6M and G.H₂O₂/H₂SO₄ images suggestive of greater demineralization when compared to the other groups. The G.H₂O₂/H₂SO₄ showed an intense demineralization on the surface, when compared to the other groups, revealing exposed dentinal tubules, below the level of the dentin surface, with intertubular demineralization, resembling scaffolds. Analysis in SEM-EDS showed a diversified composition of O, C, P and Ca in the groups G.H₂O₂/H₂SO₄ and G.HCl-0.6M. Conclusion. Through the use of density determination by the Archimedes method, it was possible to identify the best demineralizing potential in HCl-0.6M, H₂O₂/H₂SO₄ and EDTA solutions, resulting in more adequate microporosity characteristics in terms of micropore depth. The use of the G.H₂O₂/H₂SO₄ solution allowed the formation of interconnected micropores, suggesting better pore structures for application in scaffolds, when compared to the other solutions studied.

Keywords: Scaffold; autogenous graft; demineralized dentin matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Enxerto dentinário em bloco.	12
Figura 2.	Metodologia de preparo das amostras.....	26
Figura 3.	Pré-processamento para o ensaio de perda de massa.....	28
Figura 4.	Kit para determinação da densidade de sólidos por princípio de Arquimedes, pertencente ao LATEP/DIMAT/INT	30
Figura 5.	Imagens MEV dos grupos G.Control e G.EDTA.....	40
Figura 6.	Imagens MEV do grupo G.NaOCl.....	41
Figura 7.	Imagens MEV dos grupos G.HCl-0,6M e G.H ₂ O ₂ /H ₂ SO ₄	43
Figura 8.	Diâmetro dos túbulos dentinários.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.	Média da perda de massa e determinação da densidade final, da densidade relativa final e da poros. final após os ensaios de desmineralização.....	38
GRÁFICO 2.	Análise química por espectrometria de energia dispersiva de Raios-x. Análise dos espectros identificados nas superfícies dos grupos após a ação das diferentes soluções desmineralizadoras.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Lista de materiais e equipamentos utilizados.....	23
TABELA 2.	Etapas de lavagem dos Corpos de prova.....	27
TABELA 3.	Determinação da densidade pelo método Arquimedes. Valores dos CPs nas etapas de massa seca, massa aparente e massa úmida.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

BMPs Proteínas morfogênicas ósseas exógenas

CPs Corpos de prova

DBM Matriz óssea insolúvel em ácido

DDM Matriz dentinária desmineralizada

DMO Densidade mineral óssea

DR Densidade relativa

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl Ácido clorídrico

ICP Plasma acoplado indutivamente

IGF-II Fator de crescimento semelhante a insulina

INT Instituto Nacional de Tecnologia

ISO International Standards Organization

MAP	Massa aparente
MDD	Matriz dentinária desmineralizada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	Massa seca
MTA	Agregado Trióxido Mineral
MU	Massa úmida
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
ROG	Regeneração óssea guiada
RPM	Rotação por minuto
TGF	Fator de crescimento transformador

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

A regeneração óssea guiada (ROG) visa o ganho de volume ósseo vertical e horizontal em rebordos atróficos, sendo utilizadas diferentes técnicas regenerativas associadas a biomateriais. A preservação do volume dos processos alveolares constitui um desafio para o cirurgião-dentista que visa a reabilitação do paciente com próteses implanto-suportadas. Para tais situações a técnica de ROG e os implantes imediatos são as opções terapêuticas de escolha (De Carvalho *et al.*, 2004).

A técnica de ROG objetiva minimizar o processo fisiológico da remodelação óssea pós exodontia para instalação de implantes ósseo integrados mantendo a espessura e a altura óssea, sendo indicada para reconstrução de rebordos alveolares (Pinto *et al.*, 2000). Ela está baseada na hipótese de que uma membrana age como barreira física quando sobreposta ao defeito ósseo, evitando a presença de células indesejáveis ao reparo ósseo, tais como do epitélio bucal e do tecido conjuntivo, e assim facilitando o processo de regeneração óssea que ocorre em uma taxa mais lenta que os tecidos moles (De Carvalho *et al.*, 2004; Sheikh *et al.*, 2015). As membranas reabsorvíveis, como as à base de colágeno, e as não reabsorvíveis, como as à base de politetrafluoretileno expandido, PTFE-e, e a denso, PTFE-d, são utilizadas para estabilizar o enxerto, limitar a reabsorção do enxerto e atuar como barreira oclusiva para os tecidos moles (Sheikh *et al.*, 2015). Para se obter o sucesso é imperativo que haja, abaixo da membrana, um espaço biológico que deve ser mantido através de parafusos metálicos com o emprego da técnica da tenda ou suportar a membrana através do remanescente ósseo ou biomaterial (De Carvalho *et al.*, 2004). Logo, dependendo do volume a ser reconstruído, são necessários

parafusos de enxertias, telas de titânio ou membranas absorvíveis e grandes volumes de biomateriais.

A regeneração óssea alveolar representa um obstáculo para a instalação de implantes ósseo-integrados. A destruição ou reabsorção do rebordo alveolar pode dificultar ou até impossibilitar a instalação de implantes ósseo integrados em posição funcional ideal (Joshi *et al.*, 2019).

Regulado por diversos fatores, o processo de regeneração óssea é “uma cascata complexa e multifatorial de eventos biológicos que incluem a migração, a proliferação, a adesão e a diferenciação celular, para além da neoformação vascular”. Este processo é alcançado através da osteogênese, osteoindução e osteocondução (Dos reis Lobato, 2016).

A osteogênese consiste na formação de tecido ósseo, mesmo na ausência de células mesenquimais indiferenciadas. A transformação destas células em osteoblastos ocorre através da atuação de fatores de crescimento, sendo denominada de osteoindução (Dos reis Lobato, 2016). Já a osteocondução é o mecanismo de deposição de novo tecido ósseo sobre uma matriz, o enxerto ósseo, denominado de aposição. Os materiais osteocondutores estimulam a migração de células potencialmente osteogênicas, como osteoblastos, células perivasculares e células estaminais de medula óssea. Logo o enxerto ósseo deve permitir a colonização, proliferação, migração e a diferenciação celular por toda a sua estrutura de suporte (Carvalho, 2004; Dos reis Lobato, 2016).

Os biomateriais de enxerto ósseo são categorizados em autoenxerto, aloenxerto, colhido de outra espécie e transferido para mesma espécie, aloplástico, material sintetizado e derivado de uma hidroxiapatita, e xenoenxerto, tecido ósseo colhido de uma espécie diferente a que irá ser implantado. O emprego de cada um destes grupos depende de diversos fatores como volume, área a ser recuperada e

local. Dentro desta categorização o padrão ouro é o enxerto autógeno, autoenxerto, devido a sua osteoindutividade, osteocondutividade e osteogenezidade, porém sua limitação tange na necessidade da existência de um volume adequado da área doadora de enxerto, além de desenvolver um defeito ósseo no sítio doador e ocorrer uma inevitável reabsorção do enxerto no local de enxertia (Kim *et al.*, 2010; Lemos, 2019).

Já os enxertos alógenos e xenógenos podem representar um risco na propagação de infecção, além de representarem um alto custo para o paciente (Kim *et al.*, 2010). Em contrapartida, os enxertos sintéticos podem ser seguros, mas são limitados quanto a capacidade de promover osteogênese e osteoindução, limitando a sua indicação (Kim *et al.*, 2010).

Logo, um substituto ósseo ideal deve apresentar propriedades osteocondutoras, osteogênicas e osteoindutoras, além de possuir estabilidade biomecânica e capacidade de se degradar dentro de um tempo apropriado, fornecendo um ambiente favorável para invasão de vasos sanguíneos e células formadoras de osso (Janicki & Schmidmaier, 2011).

A propriedade osteocondutora pode ser modulada através da composição, característica da superfície e estrutura interna do biomaterial. Já a característica osteoindutiva e osteogênica pode ser obtida pela adição de fatores de crescimento e células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs), capazes de reconstruir estruturas ósseas e medulares (Janicki & Schmidmaier, 2011).

Os substitutos ósseos ainda podem ser divididos em materiais biológicos e sintéticos. Dentre os materiais biológicos estão os corais, polímeros naturais, como os colágenos tipo I, a matriz óssea desmineralizada (DBM) e a matriz dentinária desmineralizada (DDM) (Janicki & Schmidmaier, 2011).

Em relação aos biomateriais, a aplicação de dentes humanos como possível biomaterial para procedimentos de enxertia óssea é pouco estudada. Poucos cirurgiões-dentistas pesquisaram a dentina humana sob a ótica do biomaterial para regeneração óssea, optando por descartar como resíduos infecciosos os dentes humanos extraídos (Murata *et al.*, 2012).

Vale ressaltar a legalidade clínica no uso deste tipo de enxerto autógeno, mediante o consentimento do paciente, uma vez que, na prática odontológica são encontrados restos radiculares ou mesmo procedidos sepultamentos radiculares sem danos ao paciente (Park *et al.*, 2012; Lemos, 2019).

Além disso, a facilidade em trabalhar com a técnica da matriz dentinária desmineralizada se encontra no fato de ser considerada pela agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) como um tecido humano reprocessado e não um dispositivo médico, não necessitando passar pelos testes rigorosos de eficácia que um dispositivo médico exige (Janicki & Schmidmaier, 2011).

1.1.1 Matriz dentinária

A aplicação de enxerto ósseo autógeno dentário vem se consolidando nas pesquisas clínicas e laboratoriais (Catanzaro-Guimarães *et al.*; 1986; Joshi *et al.*, 2019), por poder ser usados como arcabouços, *scaffolds*, ou como fonte de fatores de crescimento, potencializando assim o ganho ósseo (Tabatabaei *et al.*, 2016). Dentre as técnicas de preparo, as mais estudadas são, o extrato de dentina, partículas de dentina (cinza de dente), dentina liofilizada, dentina desmineralizada e dentina desnaturada (Catanzaro-Guimarães *et al.*, 1986).

Os enxertos preparados com dentes humanos extraídos possuem semelhanças com o osso, tanto estruturalmente quanto bioquimicamente (Kim *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2019). A matriz dentinária desmineralizada (DDM) demonstrou a presença de proteínas morfogênicas ósseas exógenas (BMPs) e outros fatores de crescimento que promovem a remodelação óssea (Joshi *et al.*, 2019), como o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-II), o fator de crescimento endotelial vascular, o fator de crescimento transformador (TGF) e o fator de crescimento transformador beta (Joshi *et al.*, 2019; Lemos, 2019). Ainda são encontrados relatos da presença de osteopontina, sialoproteína dentinária, osterix e osteocalcina, podendo representar uma alternativa como substituto ósseo particulado (Lemos, 2019).

Com excelente capacidade de regeneração óssea e chance relativamente inexistente de antigenicidade, doenças genéticas e transmissão de doenças, a DDM vem se tornando foco nos estudos de biomateriais (Catanzaro-Guimarães *et al.*, 1986; Lemos, 2019). De fácil obtenção, a matriz dentinária mantém a capacidade de heteroindução óssea mesmo após o processamento em liofilização, esterilização e armazenamento sob refrigeração (Catanzaro-Guimarães *et al.*, 1986).

Os trabalhos iniciais da aplicação deste biomaterial foram iniciados por Yeomans & Urist (1967) quando relataram a indução óssea por dentina descalcificada implantadas em defeitos ósseos mandibulares e em cavidades dentárias vazias em coelhos. Após 4, 8 e 12 semanas os implantes foram avaliados histologicamente indicando uma reabsorção relativamente lenta com indução de deposição óssea sobre a dentina acelular descalcificada.

Estudos utilizando implante com matriz dentinária em forma de disco ou partículas indicaram um ativo processo de reabsorção e substituição nos sítios ósseos enxertados. O processo de reabsorção da matriz ocorre paralelamente com

a substituição pelo novo osso neoformado de forma lenta, com média de 90 dias de duração. Inicialmente, o tecido fibrocelular que envolve o biomaterial desencadeia o processo de reabsorção da superfície da matriz dentinária. A atividade colagenolítica garante a parcial degradação interna da matriz dentinária, formando lacunas onde células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos. Nesse ponto, a matriz é então substituída com a deposição óssea gradual em sua superfície e no interior do biomaterial (Catanzaro-Guimarães *et al.*, 1986).

Outros autores também já discutiram a possibilidade de utilizar enxertos desmineralizados de dentina e osso como enxertos alógenos e xenógenos (Huggins *et al.*, 1970). Entretanto, um estudo posterior indicou que a diferenciação óssea induzida por matriz extracelular ser espécie - específica, demonstrando fraca capacidade de indução óssea quando aplicadas matrizes ósseas entre espécies, de forma xenógena (Sampath & Reddi, 1983).

1.2 PROPRIEDADES OSTEOINDUTIVAS E OSTEOCONDUTIVAS

A indução é o mecanismo de diferenciação celular que depende da interação de células indutoras e células respondentes (Yeomans & Urist, 1967). A sequência de desenvolvimento da cascata na indução óssea passa pela quimiotaxia de células mesenquimais, proliferação de células progenitoras, diferenciação de cartilagem e osso, finalizando na hematopoiese (Sampath & Reddi, 1983). Inicialmente os fatores de crescimento atuam como mediadores no recrutamento das células mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos. Após o processo de maturação, estas células são capazes de sintetizar a fase orgânica da matriz óssea, chamada de osteóide, finalizando a formação ectópica do tecido ósseo (Dos reis Lobato, 2016).

O tratamento de desmineralização da dentina e do osso aumenta a osteoindutividade, e diminui a antigenicidade. Dentina e osso são quase semelhantes em componentes químicos. Ambos consistem em colágeno (20%), hidroxiapatita (70%) e fluido corporal (10%) em peso. A dentina é uma matriz acelular rica em colágeno sem vasos, enquanto o osso é um tecido celular com vasos (Murata *et al.*, 2012; Lemos, 2019). Já a DDM e a matriz óssea insolúvel em ácido (DBM) são compostos de colágeno tipo I (95%) e proteínas não colágenas, incluindo pequenas quantidades de fatores de crescimento, como BMPs endógenos (Murata *et al.*, 2012). Logo, tais achados fazem com que o dente seja um substituto indutivo ideal, induzindo a diferenciação do mesênquima em cartilagem e osso (Huggins *et al.*, 1970).

Além do tamanho e da forma da partícula de dentina, o procedimento de preparação também influencia diretamente na capacidade de osteoindução e osteocondução da matriz dentinária (Tabatabaei *et al.*, 2016). Já a sua armazenagem com autoclavagem prévia, sugere redução da força da dentina, com melhores resultados quando estocado em nitrogênio, não afetando a matriz dentinária (Tabatabaei *et al.*, 2016). Além disso, liofilização e armazenagem em tanque de nitrogênio também são relatadas por diminuir a antigenicidade dos biomateriais (Carvalho, 2014; Tabatabaei *et al.*, 2016).

Além destes fatores, a concentração, o pH do material de extração e a duração de exposição são fatores a serem considerados no protocolo. Também foi encontrado um relato de aplicação de inibidores de proteases a fim de evitar a destruição de proteínas no processo de extração (Tabatabaei *et al.*, 2016).

Quando os implantes são liofilizados, a matriz óssea é descalcificada. As proteínas globulares e fibrinosas da matriz dentinária ao permanecer em contato com as células mesenquimais desencadeiam a atividade colagenolítica tornando-as

indutoras para osteogênicas (Yeomans & Urist, 1967). A dentina após a descalcificação pode ser definida como uma matriz composta de colágeno tipo I, associada a fatores de crescimento (Murata *et al.*, 2012). Já o Cimento, um material semelhante ao osso também contém TGF, IGF I e colágeno tipo I e tipo III, contribuindo para osteoindução (Joshi *et al.*, 2019).

1.3 MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA E BMPs

A proteína morfogênica óssea humana recombinante 2 (BMP-2) é um dos fortes indutores de osso, induzindo células mesenquimais pluripotentes a se diferenciarem em osteoblastos e condrócitos (Murata *et al.*, 2012).

A combinação da matriz dentinária desmineralizada humana (DDM) com a proteína morfogênica óssea humana recombinante 2 (BMP-2) vem sendo correlacionada na potencialização da osteoindução, apresentando uma relação direta da dose da BMP-2 utilizada com o aumento da osteogênese (Murata *et al.*, 2012).

Diferentes fontes de BMP-2 foram relatadas, como a incorporação de membranas amnióticas humanas em DDM. Quando avaliadas *in vivo*, esta associação foi capaz de induzir a neoformação óssea direta com incorporação pelo tecido ósseo neoformado e remodelado, além de apresentar uma cicatrização mais rápida quando comparadas com o grupo de uso isolado de membranas amnióticas humanas (Gomes *et al.*, 2001).

Os achados histológicos demonstraram que as BMP-2/DDM aumentaram o volume ósseo e medular sequencialmente entre as partículas da DDM. Já a BMP-2 foi capaz de induzir significativamente a osteogênese de forma acelerada na dentina humana insolúvel em ácido. Esses resultados indicaram que a DDM humana é

eficaz na liberação de BMP-2 representando um arcabouço adequado para a neoformação óssea (Murata *et al.*, 2012).

Já o uso isolado do DDM não resultou em indução de tecido duro após 3 semanas, enquanto o uso associado com a BMP-2 resultou em diferenciação de condrócitos na superfície da DDM com extensa formação óssea e remodelação a nível medular. Os autores indicaram que o volume de neoformação foi diretamente proporcional ao volume utilizado de BMP, enquanto o volume de DDM diminuiu paralelamente, e mesmo a aplicação isolada da DDM foi capaz de induzir osso e cartilagem após 4 semanas (Murata *et al.*, 2012).

Outros estudos identificaram a liberação de BMPs da DDM, potencializando a regeneração óssea. As BMPs presentes na matriz dentinária possuem subunidades com certas semelhanças as BMPs presentes nos tecidos ósseos (Bessho, 1990).

Gomes *et al.* (2001) relataram a incorporação de membranas amnióticas humanas em DDM. Após o preparo das DDMs, estas foram imersas em álcool etílico 70°C/gentamicina (5 ml/0,2 sol) e armazenadas a 2°C.

1.4 TÉCNICAS DE ENXERTIAS

O enxerto autógeno ainda é considerado o padrão-ouro, podendo ser limitado pela disponibilidade na área doadora local e pela morbidade, além de apresentar uma taxa imprevisível de reabsorção do enxerto. Além disso, dependendo da extensão da perda, o aumento tridimensional pode requerer um volume considerável de enxertia (Joshi *et al.*, 2019) que pode não estar disponível no paciente.

Os enxertos ósseos de dentes autógenos são desenvolvidos e estudados na forma particulada, pulverizada e em bloco. O tipo bloco possui capacidade osteoindutiva, através da molhabilidade do sangue, e osteocondutiva, através da manutenção do espaço a ser regenerado com uma lenta substituição. Já o tipo em pó é estudado em diferentes granulações e porosidades, possuindo osteocondução, osteoindução e lenta substituição. Ambos são relatados em preservação alveolar, restauração estética do osso alveolar, fechamento de membranas sinusais e aumento da estabilidade precoce do implante (Kim *et al.*, 2010; Murata *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Lemos, 2019).

A forma particulada do dente com posterior aplicação como enxerto também pode ser encontrada. Kim *et al.* (2014) liofilizaram o enxerto ósseo autógeno de dente, parte sendo da coroa dentária e outra parte sendo da raiz. A análise demonstrou semelhança ao osso autógeno cortical (Kim *et al.*, 2014).

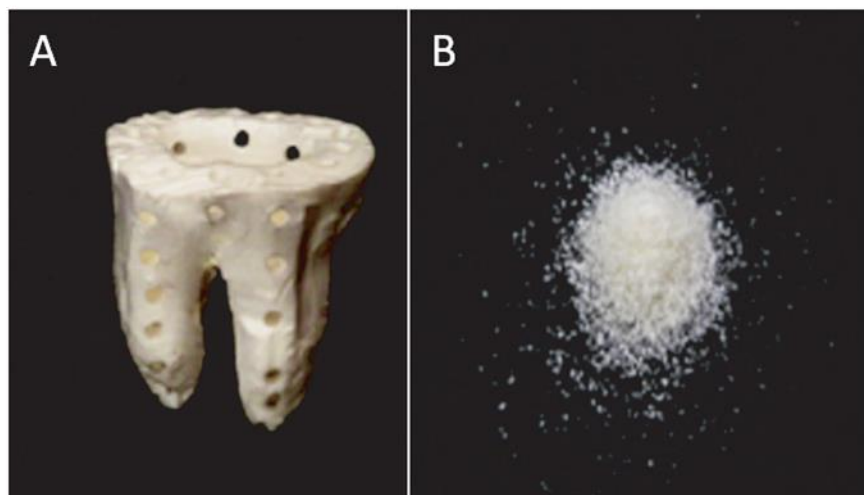
Anteriormente Kim *et al.* (2010) relataram no protocolo a necessidade de duas semanas para preparo do enxerto ósseo autógeno de dente. Os autores demonstraram o sucesso em 6 casos de extrações, com posterior preparo do enxerto, para então, duas semanas depois realizar a cirurgia de ROG associada ao enxerto ósseo autógeno de dente nestes mesmos sítios onde foram realizadas as extrações. Após o período de 5 meses foram instalados implantes com sucesso. Já em 2013, os mesmos autores relataram 12 casos clínicos de aplicação de enxertos ósseos usando dentes autógenos em blocos (bloco AutoBT) (Coréia Tooth Bank Co., Seul, Coréia) em cirurgia de regeneração óssea guiada, levantamento de seio maxilar e aumento de crista. Todos os casos apresentados tiveram resultados bem-sucedidos, com apenas um paciente que apresentou deiscência de ferida pós-cirúrgica, com posterior cura, e um implante com fracasso na osseointegração (Kim *et al.*, 2013).

Outro estudo clínico utilizou o enxerto dentinário autógeno, em pó e em bloco, em 250 pacientes para instalação de implantes, preservação alveolar pós-extração, levantamento de seio maxilar e aumento de crista óssea realizada com ROG. Somente 2 dos 133 implantes instalados apresentaram falhas na osseointegração, com perda tardia dos implantes (Park *et al.*, 2012).

Também foi possível verificar a associação de blocos e de partículas de DDM em 13 pacientes para regeneração de osteoindução, em 38 pacientes para instalação de implantes combinados com regeneração de osteoindução e em 5 pacientes para aumento de crista óssea. Já o tipo isolado foi usado em 17 pacientes para preservação de alvéolo (Park *et al.*, 2012). Possuindo alta taxa de sucesso sem complicações graves, com excelente elasticidade, flexibilidade e rápida capacidade de cicatrização óssea, sem reações inflamatórias em todos os casos estudados (Park *et al.*, 2012).

O Enxerto dentinário em bloco se divide em forma de raiz (*Root form*) e “enraizada” (*Root on*) (Fig. 1). A forma de raiz foi relatada para preservação e reconstrução do alvéolo pós-extração, pois se assemelha a uma raiz dentária. Já o *Root on* seria para aumento de crista horizontal ou vertical se assemelhando a um bloco. Ambos foram especificados em preservação de alvéolo, restauração de perfuração de membrana sinusal, aumento e estabilidade inicial de implantes (Park *et al.*, 2012).

Figura 1 - Enxerto dentinário em bloco. Forma de raiz (*Root form*) (Imag. A) e particulada (Imag. B) (Park *et al.*, 2012).



1.4.1 Associação com agregados plaquetários

Seguindo o protocolo do banco de tecidos do hospital Memorial de Tatá, Índia, foram preparados aloenxertos a partir de dentes humanos associados com cola de fibrina autóloga, utilizando 2700 rotações por minuto (RPM) por 2 min, permanecendo em contato os biomateriais de 5 a 10 min até formar o *Sticky bone*, para então serem aplicados em um paciente de 43 anos na região do dente 13, com grande perda vertical e horizontal alveolar. Após 4 meses, houve um aumento tridimensional bem-sucedido da crista alveolar (Joshi *et al.*, 2019).

1.5 TÉCNICAS DE PREPARO DA DENTINA DESCALCIFICADA: PROTOCOLOS DE OBTENÇÃO DE DDM

Em 1967, Yeomans & Urist (1967) abriram a possibilidade da aplicação da técnica da DDM. Os autores relataram a descalcificação da dentina com HCl 0,6N,

seguindo de lavagem, esterilização e armazenamento em álcool 70% até o momento da implantação.

Diferentes métodos foram relatados no preparo da dentina como, extração de dentina, partículas de dentina (cinza de dente), dentina liofilizada, dentina desnaturada e desmineralização dentinária (Gomes *et al.*, 2001; Tabatabaei *et al.*, 2016). Sendo este último, o processo mais utilizado na engenharia de tecido (Tabatabaei *et al.*, 2016).

Logo, os Protocolos de preparo de dentina foram categorizados em 4 grupos:

A - Preparação de dentina por extração de matriz orgânica de dentina não colágena: utilizado para extração de proteínas na dentina. É empregado cloreto de guanidínio, hidróxido de cálcio, agregado de trióxido mineral (MTA), alguns tipos de ácidos e EDTA. Sendo este último, o que apresentou melhores resultados na extração (Tabatabaei *et al.*, 2016);

B - Preparação de dentina por desmineralização: um dos mais antigos protocolos utilizados (Tabatabaei *et al.*, 2016). A dentina desmineralizada apresenta dois tipos de porosidade, a dos túbulos dentinários e a da malha de colágeno (Vennat *et al.*, 2009). Com a desmineralização, os túbulos dentinários são aumentados (Vennat *et al.*, 2009);

C - Preparação de dentina por eliminação de matriz orgânica (Tabatabaei *et al.*, 2016) e

D - Preparo de dentina não modificada: Este tipo de estudo passou a ser realizado a partir de controles de dentina não modificada, apenas com o armazenamento em tanques de nitrogênio e modificações mínimas com a liofilização (Tabatabaei *et al.*, 2016).

Os protocolos do preparo de dentina por desmineralização em dentes humanos relataram o esmagamento dos dentes até alcançar partículas de 0,4 a 0,8 mm, com posterior desmineralização em HCl 0,6M e liofilização. Resumidamente, os dentes foram esmagados em nitrogênio líquido, lavados em cloreto de sódio 1,0 M e completamente desmineralizados em solução de HCl 0,6M para a DDM. As partículas da DDM foram extensivamente enxaguadas em água destilada e liofilizadas. Após análise, a DDM foi confirmada como um material livre de minerais por espectrômetro de emissão atômica de plasma acoplado (ICP). O colágeno de dentina não é expandido em solução de HCl 0,6M (Murata *et al.*, 2012).

Um protocolo similar analisou o padrão de regeneração óssea com implantes de DDM na forma de discos e de partículas, em defeitos ósseos mandibulares em cães, utilizando ácido clorídrico a 0,6 N por 5 dias a 2°C. As análises histopatológicas revelaram uma capacidade osteogênica superior dos discos de DDM ao comparar com a forma particulada. Os discos de DDM foram incorporados, resultando em um osso trabeculado unido a dentina (Catanzaro-Guimarães *et al.*, 1986). Posteriormente, foram propostas alterações neste protocolo, como Gomes *et al.* (2001) que relataram a extirpação da polpa dentária por uma técnica retrógrada seguindo a remoção dos resíduos do ligamento periodontal. Em sequência, os dentes foram lavados com soro fisiológico estéril a 2°C, imersos em solução de ácido clorídrico 0,6 N a 2°C, até a desmineralização completa, não relatando este tempo, e então lavados em água destilada sob agitação constante por 3 horas para a remoção total do ácido.

A matriz de dentina em blocos possibilita um aumento de superfície para o contato com as células mesenquimais indiferenciadas quando comparada a forma particulada. Para Catanzaro-Guimarães *et al.* (1986), tal afirmativa responderia a

maior citodiferenciação, com consequente regeneração óssea dos discos de DDM quando comparadas a forma particulada.

Alguns detalhes também devem ser verificados nos testes protocolares, como a necessidade de hidratar a DDM com solução fisiológica de 15 a 30 min antes da utilização, devido à prévia desmineralização e secagem (Park *et al.*, 2012). Já a aplicação do nitrogênio líquido durante o processo de pulverização das matrizes tem a função de evitar a geração de calor e assim a desnaturação de proteínas da matriz óssea (Sampath & Reddi, 1983).

Na patente intitulada “Método para produzir um material de transplante de osso e material de transplante de osso produzido pelo mesmo”, concedida a Park & Lee (2013), foram verificadas diferentes etapas na metodologia da MDD. Os autores evidenciaram a possibilidade de realização desta técnica com sonicação associada ou não a vácuo, com melhores resultados quando em associação. A fim de prevenir uma destruição dos tecidos, porém, com uma eficiente desmineralização, a sonicação deve ocorrer de 15 KHz a 40 KHz e quando associada a vácuo de 100 mm/Hg a 600 mm/Hg, podendo ser reduzida para a faixa de 10 mm/Hg a 700 mm/Hg, a 60°C.

As etapas abaixo são parte das reivindicações contidas na patente de Park & Lee (2013). Os autores dividiram o protocolo nas seguintes etapas:

S1 - Remoção e lavagem de tecidos moles e polpa dentinária de dentes – Nesta etapa se inclui a separação da coroa com a raiz, com perfurações diversas por toda a superfície. As perfurações devem ser realizadas com brocas de alta rotação, sendo indicado de 10 a 16 orifícios por cm², melhorando assim a permeabilidade, permitindo a penetração das soluções.

S2 - A solução utilizada pode ser peróxido de hidrogênio de 3 a 7% ou etanol, durante 15 min.

S3 – Imersão em solução de ácido clorídrico 0,5 N a 2 N, preferencialmente entre 0,5 N e 0,6 N e com volume de solução de 50 a 100 ml a 60 C°, de 60 a 75 min. Esta etapa garantiria a remoção dos componentes orgânicos, mantendo as proteínas ou as semelhantes à formação óssea.

S4 – Imersão em solução de PBS com inibidor de proteases que acompanha a sonicação. Deve-se proceder a extração e remoção de proteínas solúveis em ácido, devido à possibilidade de ativar outras proteínas com função de indução para neoformação óssea assim como inibir a neovascularização, fundamental para a osteogênese óssea.

A solução de PBS adicionada ao acetado de iodeto e azida de sódio, com pH entre 7 e 8, com melhor resultado com pH 7,4 a 60 C°, de 5 a 10 min, são indicadas por reter proteínas.

S5 - Solução de cloreto de cálcio, 1,5 N a 2,5 N pH 7-8. Esta etapa visa preservar as proteínas não colágenas como a proteína de matriz dentinária e sialofosfoproteínas dentinária;

S6 – Solução de EDTA a 60 C°, de 5 a 10 min e volume de 10 a 20 ml por dente. O pH deve ser ajustado entre 7 e 8, preferencialmente pH 7,4. Esta etapa objetiva a extração dos proteoglicanos de baixo peso molecular do dente extraído. Além do EDTA, podem ser utilizados cloreto de lítio, solução de cloreto de guanidina (4 a 5 M), ureia (6 a 8 M) ou cloreto de potássio.

S7 – Se o colágeno permanecer gelatinoso, pode-se incluir uma solução de cloreto de lítio de 7 a 9 M, pH 7 – 8, de 5 a 10 min, 60 C° e volume da solução de 10 a 20 ml por dente. A aplicação desta etapa visa encolher a fibrila de colágeno e converter o colágeno do dente por gelatina.

S8 – Água destilada, 50 a 200 ml. Nesta etapa ainda pode ser utilizado o etanol, no lugar da água destilada.

S9 – Após a etapa acima, a MDD pode ser usada em até 2 h ou armazenada em congelador ou liofilizada. Caso seja necessário esterilizar o dente, os autores indicam a utilização de óxido de etileno.

Da etapa S5 até a S8, espera-se remover as proteínas indesejadas enquanto se retêm as proteínas ósseas para formação óssea, pH 7 – 8 (Park & Lee, 2013). O efeito da sonicação a vácuo foi indicado para controlar a cavitação, removendo bolhas presas a superfície e induzindo a penetração das soluções no interior das amostras (Park & Lee, 2013).

Assim como neste projeto, os autores Park & Lee (2013) também realizaram pesagem antes e após os ensaios de MDD correlacionando a desmineralização com o tipo de técnica aplicada, com e sem vácuo associado à sonicação.

Possibilitar a indução óssea por dentina descalcificada em implantes na mandíbula seria um marco crucial no campo da implantodontia. Porém, o processo de preparação, o tamanho e a forma da partícula, que desempenham um papel crucial na osteoindução e na osteocondução, ainda são questões pouco estudadas quando comparadas a outros biomateriais para a diferenciação osteogênica (Yeomans & Urist, 1967). A indução óssea por proteínas de dentina e matriz óssea representam um importante e novo modelo de pesquisa básica sobre o problema não resolvido de citobioquímica da osteogênese (Yeomans & Urist, 1967).

1.6 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PELO MÉTODO ARQUIMEDES

O método teórico é uma abordagem capaz de avaliar e estimar a porosidade de *scaffolds* (Ho & Hutmacher, 2006). As duas principais abordagens teóricas são análise de cubo unitário e técnica de massa. A primeira, indicada para poros regulares, fabricados por meio de prototipagem rápida, de forma uniforme com

camadas que não se fundem (Ho & Hutmacher, 2006), enquanto na técnica de massa, o volume do andaime é obtido dividindo a massa do andaime pela densidade do material, sendo indicada para *scaffolds* poliméricos. Nesta análise a densidade do polímero é dependente do estado amorfo e cristalino.

Diferentemente das metodologias acima, no método de Arquimedes, a massa seca do *scaffold* é registrada, ocorrendo posteriormente a imersão. Quando o *scaffold* é submerso sob água, a massa submersa é registrada. Sequencialmente, o biomaterial é removido da água e sua massa úmida é medida. Baseado nestes valores é possível calcular a valor de porosidade (Ho & Hutmacher, 2006; ASTM B962-17, 2017). Diferentes trabalhos relataram o uso do método de Arquimedes na avaliação de biomateriais (WERS *et al.*, 2015). Wers *et al.* (2015) avaliaram a porosidade de um biomaterial, depositado sobre a superfície metálica de implantes, através do método de Arquimedes, indicando uma porosidade total de 58%.

2. JUSTIFICATIVA

A fim de buscar alternativas menos dolorosas e onerosas para o paciente e que representem uma redução no número de intervenções cirúrgicas, estudos no campo dos biomateriais vem convergindo para a utilização de dentes autólogos do paciente para a aplicação no mesmo sítio e ato cirúrgico em que esse dente foi extraído. Tais técnicas envolvem diferentes protocolos para o desenvolvimento da DDM. Entretanto, não existe uma padronização destes protocolos e a restrita literatura que aborda esse tema descreve casos clínicos ou ensaios em animais, sem a real e necessária análise biológica e microbiológica desta técnica. Mais além, não foram encontrados até o momento artigos que relatam avaliações *in-vitro* quanto à caracterização da interface implante osseointegrado com os biomateriais oriundos de dentina humana.

Um dos objetivos é a avaliação de um biomaterial autógeno, a fim de serem aplicados em defeitos ósseos extensos durante a técnica cirúrgica de regeneração óssea guiada.

Avaliar o desenvolvimento deste biomaterial nas diferentes técnicas relatadas de protocolos, necessitando de uma visão multidisciplinar de: 1- BIOMATERIAIS: no desenvolvimento deste tipo de enxerto, em análises histomorfológicas da estrutura dentinária; 2- MICROBIOLÓGICA: para a caracterização da microestrutura, da identificação, análise e quantificação de colágeno, da hidroxiapatita e de componentes que possam representar a ocorrência de reação antigênica ao receptor, assim como a presença de microrganismos persistentes; 3 – MATERIAIS: estudando a interação da interface implante ósseo-integrado e enxerto e como esta interação pode influenciar a longo prazo a estabilidade mecânica dos implantes.

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Pós – LATEP e Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação do Instituto Nacional de Tecnologia (INT) em colaboração com o Laboratório de Biomateriais do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade do Grande Rio (PPGO-UNIGRANRIO), utilizando a infraestrutura laboratorial existente nas duas instituições.

3. OBJETIVO(S)

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar um protocolo metodológico com maior eficiência desmineralizadora para o tratamento químico de enxerto autógeno da matriz dentinária desmineralizada (DDM), padronizando a melhor metodologia a ser empregada para a produção da DDM.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Determinar e comparar o perfil mineral, trabecular, das matrizes de dentina após a imersão nas diferentes soluções empregadas, através do microscópio eletrônico de varredura;

2 – determinar através do método de Arquimedes a densidade, a densidade relativa e a porosidade das matrizes de dentina, antes e após a imersão nas diferentes soluções empregadas e;

3 – determinar a solução com melhor capacidade desmineralizante para o emprego no desenvolvimento da matriz dentinária descalcificada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de manter atualizada as diferentes metodologias da técnica de DDM no desenvolvimento de matrizes para enxertos ósseos, durante todo o projeto foi realizada uma busca eletrônica nos bancos de dados da PubMed/MEDLINE, LILACS, EMBASE, Web of Science e Scopus e bases da literatura como Google Scholar, Proquest Dissertation and Theses e OpenGrey com as palavras-chave: *dentin, tooth, stem cells, osteogenic, differentiation, graft, bone regeneration, dentin preparation, processed dentin, tissue engineering, dentin noncollagenousproteins, demineralized dentin, denatured dentin, tooth ash, e scaffolds.*

4.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO) sob o número: CAAE 47984521.0.1001.5283.

Foram utilizados 310 dentes unirradiculares e/ou multirradiculares, nos ensaios *in vitro* obtidos através de doação de pacientes atendidos em consultório particular e em atendimento na clínica de implantodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UNIGRANRIO (PPGO-UNIGRANRIO) e da Clínica Integrada de Adultos da Faculdade de Odontologia da UNIGRANRIO. Em um primeiro momento, estes dentes foram avaliados através de exame clínico e radiográfico. Quando diagnosticada a necessidade de extração do elemento dentário, foi exposta ao paciente a opção de doar este elemento dentário a fim de participar do projeto de pesquisa. Todos os pacientes foram esclarecidos através da explicação detalhada dos procedimentos a serem executados e da leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**APÊNDICE 1 e 2**). Foram utilizados como critério de inclusão: dentes hígidos com indicação de extração dentária.

Como critério de exclusão foram utilizados dentes com restauração coronária e endodôntica e/ou com destruição coronária. O projeto não representa riscos para o paciente, uma vez que os dentes doados foram provenientes de indicação de extração prévia, por motivos ortodônticos, de perda óssea vertical acentuada e/ou extração de siso.

A coleta foi realizada imediatamente após a extração do elemento dentário, sendo este conservado em soro fisiológico, congelado e armazenado no biorrepositório, localizado no Laboratório de Biomateriais do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UNIGRANRIO (PPGO), criado com a finalidade exclusiva de armazenar os elementos dentários obtidos durante o projeto de pesquisa.

4.2 LISTA DE MATERIAIS UTILIZADOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os materiais, reagentes e equipamentos descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Lista de materiais, reagentes e equipamentos utilizados.

Reagentes	Equipamentos	Materiais
soro fisiológico	Ultrassom Elmasonic P 30H, Elma Schmidbauer GmbH, Germany	Pinça delicada
Água destilada	Aparelho de corte, Isomet,	Frasco tipo penicilina 10ml

	Isomt Low Speed Saw, Buehler	
EDTA trissódico	Microtomógrafo computadorizado SkyScan 1174v2, BrukermicroCT, Kontich, Bélgica	Placas de acrílico
Hipoclorito de Sódio a 2,5%	Ultrassom, Maxiclean 750A c/aquecimento	Cera pegajosa
Ácido clorídrico 0,6M	Placa de aquecimento, IKA® Ret Basic	Programa computacional, NRecon v.1.6.3 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica
Peróxido de hidrogênio PA 10 ml e ácido sulfúrico 10 ml	Balança de precisão milissemal, Uni Bloc Shimadzu, AUY220	Programa computacional, CTAn v.1.12 (Brucker-microCT, Kontich, Bélgica
Álcool etílico 99,8%	Estufa de secagem, NT 512, Novatecnica	Pisseta
	Dissecadora	Termômetro
	Microscopia eletrônica de varredura,	Pano absorvente

		Modo Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x MEV-EDS
		Kit de Arquimedes
		Proveta
		Pipeta
		Becker
		Dentes

*Material cedido pelo Instituto Nacional de Tecnologia (INT), por meio da co-orientação do Dr. Alexandre Antunes Ribeiro.

4.3 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA

Após a extração, os dentes obtidos seguiram o seguinte protocolo de preparo para os corpos de prova (Fig. 2):

A – imersão em soro fisiológico e congelamento até o momento de uso;

B – limpeza mecânica para remoção de restos e tecidos na face externa da raiz dentária;

C- limpeza em ultrassom.

C.01 - um becker com água destilada foi levado há uma cuba ultrassônica (Elmasonic P 30H, Elma Schmidbauer GmbH, Germany) com frequência de 30 Hertz (Hz) por 4 min a 40 °C, para liberação de partículas gasosas;

C.02 - em seguida os dentes foram imersos no ultrassom com os parâmetros ajustados para 80 Hz a 40 °C por 10 min;

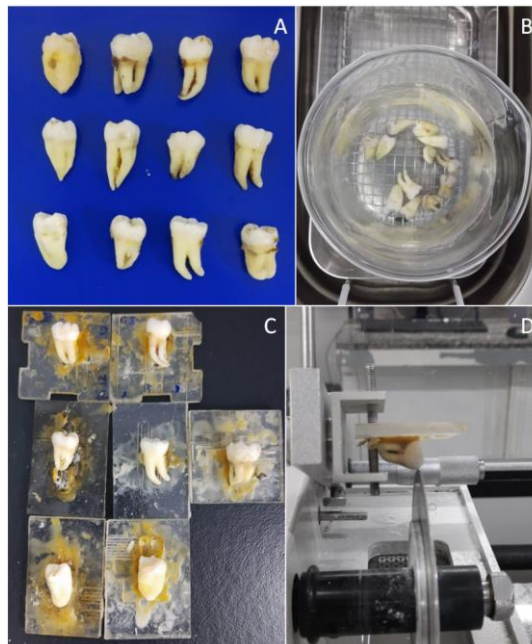
D – preparo dos discos de dentina: os dentes foram fixados em placas de acrílico com cera pegajosa para realizar cortes de 3 a 4 mm de espessura na

máquina de corte Isomet (Isomt Low Speed Saw, Buehler), para a confecção dos corpos de prova. Em seguida foram seccionados horizontalmente sob refrigeração constante, formando discos de 3-4 mm de espessura. Cada dente foi dividido em três grupos:

Grupo 1 – Porção radicular: obtidos de cortes preparados da área do cimento radicular, abaixo da linha amelocementária.

Grupo 2 – Porção coronária: obtidos de cortes da área da coroa dentinária, acima da linha amelo-dentinária.

Figura 2 – Metodologia de preparo das amostras. Seleção dos dentes (A), seguido da limpeza em ultrassom (B) e da fixação das amostras (C), para a realização dos cortes em discos dentinários (D).



4.4 ANÁLISE PRÉ-DESCALCIFICAÇÃO

4.4.2 Preparo das amostras

Previamente, os corpos de prova (**CPs**) foram submetidos a uma etapa de limpeza:

1 – A cuba ultrassônica (Maxiclean 750A com aquecimento) foi alimentada com água destilada aquecida previamente a 74 °C em placa de aquecimento (IKA® Ret Basic). Durante todo o processo as amostras foram mantidas a 60 °C ± 5 °C;

2 – os CPs foram inseridos em frascos tipo penicilina de 10 ml, com 5 ml de água destila. O conjunto foi levado para o banho em cuba ultrassônica por 20 min a 25 kHz;

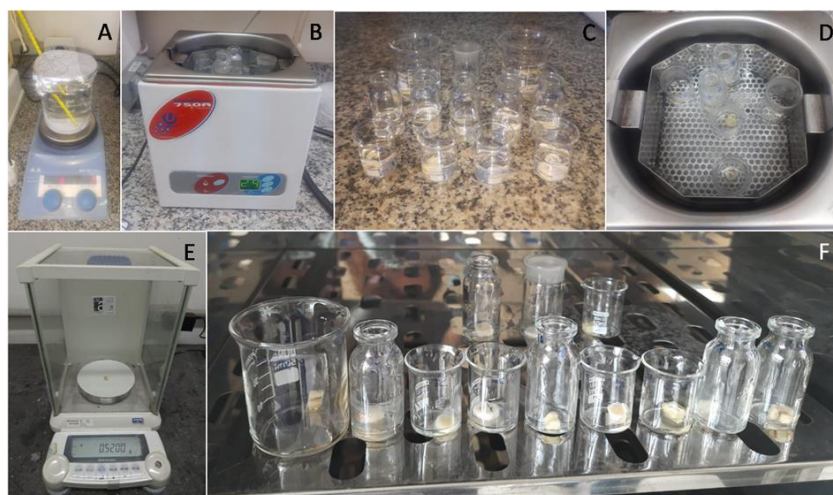
3 – as amostras foram rinçadas em água destilada por 3x nos frascos tipo penicilina e;

4 – as amostras que ainda apresentavam impurezas voltaram para novo ciclo de lavagem, descrito acima a partir da etapa 2, por 5 min (**Tab. 1 e Fig. 3**).

Tabela 2 – Etapas de lavagem dos Corpos de prova.

Amostra	1º Ciclo de lavagem	2º Ciclo de lavagem
CP 1 - Raiz	X	
CP 2 – Coroa		X
CP 2 - Raiz	X	
CP 3 - Coroa		X
CP 3 – Raiz	X	
CP 4 – Coroa		X
CP 4 – Raiz	X	
CP 5 – Coroa		X
CP 5 – Raiz		X
CP 6 - Coroa	X	
CP 6 - Raiz	X	
CP 7 – Coroa	X	
CP 7 - Raiz	X	
CP 10 - Coroa		X
CP 10 - Raiz	X	

Figura 3 – Pré-processamento para o ensaio de perda de massa. Aquecimento e agitação em placa de aquecimento (A), seguido de banho em cuba ultrassônica (B) em água destilada (C e D). Finalizando a etapa com a pesagem em balança milesimal (E) e acondicionamento em estufa (F).



Após as etapas acima, os CPs foram acondicionados em estufa de secagem (NT 512, Nova técnica) por 1h a 100°C, a fim de remover toda a umidade residual para determinar a densidade pelo método de Arquimedes e a perda de massa.

4.5 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PELO MÉTODO ARQUIMEDES

Os ensaios para a determinação da densidade pelo método de Arquimedes foram baseados na norma ASTM B962-17 (ASTM B962-17, 2017) e seguiram as etapas descritas a seguir.

4.5.1 Massa Seca (Ms)

Inicialmente foram determinados os valores de Massa Seca (Ms) para cada corpo de prova (CP). Cada CP foi pesado em balança de precisão milissemal (Uni Bloc Shimadzu, AUY220) (Tab. 2) com kit para determinação da densidade de sólidos por princípio de Arquimedes, pertencente ao LATEP/DIMAT/INT.

Após esta etapa as amostras foram acondicionadas em dissecadora.

4.5.2 Massa Aparente ou massa submersa (Map)

Com os CPs imersos em 5ml de água destilada em frascos tipo penicilina de 10 ml, as amostras foram levadas para a placa de aquecimento (IKA® Ret Basic), em banho maria com água destilada aquecida a 100 °C por 1 hora, para preenchimento dos poros com água e eliminação de ar dos poros e da superfície dentinária.

As amostras permaneceram submersas até o completo resfriamento à 26°C, quando foi realizada a nova pesagem em balança milesimal para obter-se a medida de massa aparente (MAP) de cada CP (Tab. 2). Esse sistema de pesagem foi composto por kit para determinação de densidade pelo método de Arquimedes submergindo o CP na água à temperatura ambiente até estabilização do peso na balança (Fig.4).

4.5.3 Massa úmida (Mu)

Em seguida, foi removido o excesso de água da superfície dos CPs com um pano umedecido com água destilada à temperatura ambiente e realizou-se a pesagem (Tab. 2).

Figura 4 – kit para determinação da densidade de sólidos por princípio de Arquimedes, pertencente ao LATEP/DIMAT/INT.



Tabela 3 - Determinação da densidade pelo método Arquimedes. Valores dos CPs nas etapas de massa seca, massa aparente e massa úmida.

Amostra	Ms	Map	MU	Temperatura da água durante a pesagem (°C)
CP1 Raiz	0,2822 g	0,1595 g	0,3072 g	26 °C
CP2				26 °C
Coroa	1,0127 g	0,6343 g	1,0282 g	
CP2 Raiz	0,4169 g	0,2255 g	0,4475 g	26 °C
CP3				26 °C
Coroa	0,4033 g	0,2461 g	0,4135 g	
CP3 Raiz	0,5195 g	0,2842 g	0,5562 g	26 °C
CP4				26 °C
Coroa	0,9562 g	0,5860 g	0,9659 g	
CP4 Raiz	0,2473 g	0,1317 g	0,2614 g	26 °C
CP5				26 °C
Coroa	0,8188 g	0,5002 g	0,8383 g	

CP5 Raiz	0,3857 g	0,2171 g	0,4228 g	26 °C
CP6				26 °C
Coroa	0,4602 g	0,2893 g	0,4763 g	
CP6 Raiz	0,4677 g	0,2620 g	0,5110 g	26 °C
CP7				26 °C
Coroa	0,7723 g	0,4653 g	0,8076 g	
CP7 Raiz	0,2508 g	0,1351 g	0,2765 g	26 °C
CP10				26 °C
Coroa	0,5888 g	0,3643 g	0,6088 g	
CP10				26 °C
Raiz	0,4692 g	0,2516 g	0,4989 g	

4.5.4 Cálculo da densidade

A partir dos dados obtidos acima foi possível estabelecer os seguintes parâmetros iniciais antes dos ensaios de imersão com as soluções de desmineralização.

Determinou-se a densidade (ρ) pela fórmula:

$$\rho = [MS/(Mu - Map)] \times \rho_{H2O}.$$

Onde o valor da densidade da água foi determinado em função da temperatura medida durante o ensaio.

4.5.5 Cálculo da densidade relativa

Determinou-se a Densidade Relativa (**DR**) pela fórmula:

$$DR = (\rho_{\text{Amostra}}/\rho_{\text{dente}}) \times 100$$

onde $\rho_{\text{dente}} = 2,14 \text{ g/cm}^3$ é a densidade teórica da dentina (Anusavice *et al.*, 2013) e

$\rho_{\text{esmalte}} = 3,0 \text{ g/cm}^3$ é a densidade teórica das amostras da porção coronária.

4.5.6 Cálculo da porosidade

Determinou-se a Porosidade (**Poros.**) pela fórmula:

$$\text{Poros.} = 100 - DR$$

4.5.7 Imersão da matriz dentinária desmineralizada

Após as análises prévias de determinação da densidade por princípio de Arquimedes, os discos de matriz dentinária foram imersos nas soluções abaixo sob agitação ultrassônica a 60 °C, por 1 hora a 25 KHz, onde n é o número de amostras tratadas em cada solução:

A. **G.Control:** controle negativo, Água destilada (n = 3): Neste grupo foram utilizadas as amostras CP 2 – Coroa, CP 2 – Raiz e CP 3 – Raiz;

B. **G.EDTA:** controle positivo, EDTA trissódico (n = 3): Neste grupo foram utilizadas as amostras CP 3 – Coroa, CP 4 – Coroa e CP 4 – Raiz;

C. **G.NaOCl:** hipoclorito de sódio a 2,5% (n = 3): Neste grupo foram utilizadas as amostras CP 5 – Raiz, CP 5 – Coroa e CP 7 – Coroa;

D. **G.HCl-0,6M:** ácido clorídrico 0,6M (n = 3): Neste grupo foram utilizadas as amostras CP 7 – Raiz, CP 10 – Coroa e CP 10 – Raiz e

E. **G.H₂O₂/H₂SO₄:** peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico (n = 3): Neste grupo foram utilizadas as amostras CP 1 – Raiz, CP 6 – Coroa e CP 6 – Raiz.

Para determinar a melhor concentração a ser utilizada nesta solução, foram utilizadas 3 amostras de sacrifício onde foram testadas as seguintes proporções:

1:1- 10 ml de H₂O₂ + 10 ml de H₂SO₄.

1:2- 14 ml de H₂O₂ + 7 ml de H₂SO₄.

1:3- 15 ml de H_2O_2 + 5 ml de H_2SO_4 .

Os reagentes H_2O_2 e H_2SO_4 foram solubilizados em banho de gelo para controlar a exotermia. A mistura ficou em repouso no banho de gelo até atingir a temperatura ambiente ($26^\circ C$). Caso ocorresse um resfriamento acentuado, a solução ficaria em repouso até atingir a temperatura ambiente. Somente após essa etapa, ocorreu o tratamento das amostras.

Essas amostras foram imersas em 5 ml de H_2O_2 / H_2SO_4 em frascos tipo penicilina de 10 ml, cada frasco contendo uma amostra e uma concentração diferente (1:1, 1:2 e 1:3) e o conjunto foi colocado em banho na cuba ultrassônica contendo água destilada pré-aquecida a $60^\circ C$, por 1 hora a 25 KHz.

Após 1 hora foi observado que as amostras de sacrifício não demonstraram alterações visuais significativas, sendo assim, foi protocolizada a concentração 1:1 para o tratamento das amostras CP 1 – Raiz, CP 6 – Coroa e CP 6 – Raiz.

Como procedimento geral foram respeitados os seguintes critérios: a peça a ser descalcificada não deveriam possuir mais do que 5 mm de espessura e o volume da mistura descalcificadora deveria ser de dez a vinte vezes às dimensões da peça a ser descalcificada.

Após tal etapa, os CPs foram acondicionados em estufa por 1h a $100^\circ C$, a fim de remover toda a umidade residual para realização do ensaio imersão para o desenvolvimento das DDMs.

4.6 Imersões para DDMs

Os CPs foram imersos em 5 ml, da solução descalcificadora correspondente de seu grupo, em frascos tipo penicilina de 10 ml e o conjunto foi colocado em banho na cuba ultrassônica contendo água destilada pré-aquecida a $60^\circ C$, por 1

hora a 25 KHz. Após esse período os CPs foram removidos, passando para a etapa de lavagem.

4.6.1 Lavagem após imersão

Para os grupos G.EDTA, G.NaOCl, G.HCl-0,6M e G.H₂O₂/H₂SO₄ foi elaborada uma sequência de enxágue a fim de neutralizar a ação química de cada agente.

Primeiro, os CPs foram enxaguados com 5 ml de água destilada por 10 min a 25 KHz em cuba ultrassônica, com a temperatura do banho mantida em 60°C. Em sequência procedeu-se a imersão em 5 ml de álcool etílico 99,8%, em frascos tipo penicilina de 10 ml, em cuba ultrassônica por 10 min, 25 KHz. e temperatura ambiente.

4.7 Análise pós-descalcificação

4.7.1 Perda de massa

Os CPs foram pesados novamente em balança de precisão milesimal (Bel Engineering), possibilitando quantificar a perda mineral dos DDMs, através da diferença entre a Ms após as imersões e a Ms antes das imersões, correlacionando os dados obtidos com o tipo de solução aplicada. Para a determinação da perda de massa foi utilizado o cálculo abaixo:

$$\text{Perda de massa \%} = \frac{M_s \text{ (após a imersão)} - M_s \text{ (antes da imersão)}}{100}$$

4.7.2 Densidade pelo método Arquimedes

Posteriormente os CPs seguiram a mesma metodologia na determinação da densidade pelo método Arquimedes, obtendo-se a densidade final (ρ), Densidade Relativa final (DR) e Porosidade final (Poros.), após as imersões. A partir da diferença dos dados finais com os dados iniciais foi determinada a diferença da densidade (ρ), da Densidade Relativa (DR) e da Porosidade (Poros.).

4.7.4 Análises ultraestruturais

Nesta etapa foi analisada a microestrutura e a morfologia de dois CPs de cada grupo. As superfícies das amostras foram revestidas com ouro (Au) para torná-las condutoras. Foram utilizadas magnificações de 500x, 1000x, 2500x, 5000x, 10000x e 20000x, para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV, Quanta™ 450 FEG, Oxford Instruments) e microanálise elementar por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x (MEV-EDS). O diâmetro dos túbulos dentinários nos diferentes grupos foi medido pela barra de escala calibrada do software de imagem do próprio microscópio MEV-FEG, utilizando uma imagem de cada grupo com ampliação de 5000x.

5. RESULTADOS

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prisma 5.01 (Graph Pad Software Inc), onde foram tratados através do método da análise de variância (One-Way - ANOVA) e complementados pelo post-test de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5.1 PERDA DE MASSA

A análise revelou uma maior perda de massa no G.HCl-0,6M (Perda de massa = $- 14,39 \pm 4,50 \%$), seguido pelos grupos G.H₂O₂/H₂SO₄ (Perda de massa = $- 10,12 \pm 2,94 \%$), G.EDTA (Perda de massa = $- 5,41 \pm 2,98 \%$), G.NaOCl (Perda de massa = $- 4,04 \pm 1,05 \%$) e G.Control (Perda de massa = $- 0,20 \pm 0,17 \%$). A comparação da perda de massa entre os grupos revelou diferença estatística entre: G.Control e G.HCl-0,6M; G.Control e G.H₂O₂/H₂SO₄; G.EDTA e G.HCl-0,6M; G.NaOCl e G.HCl-0,6M (Gráf.1 e Apêndice 3).

A ligeira Perda de massa observada no G.Control (Perda de massa = $- 0,20 \pm 0,17 \%$) sugeriu ser um efeito do banho ultrassônico, realizado na etapa de limpeza, levando ao desprendimento de material nos CPs ou da remoção de impurezas residuais. Das 3 amostras deste grupo, somente em 1 amostra a perda de massa foi nula, enquanto nas duas amostras restantes houve uma perda de massa de $- 0,27 \%$ e $- 0,32 \%$, respectivamente.

5.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PELO MÉTODO ARQUIMEDES

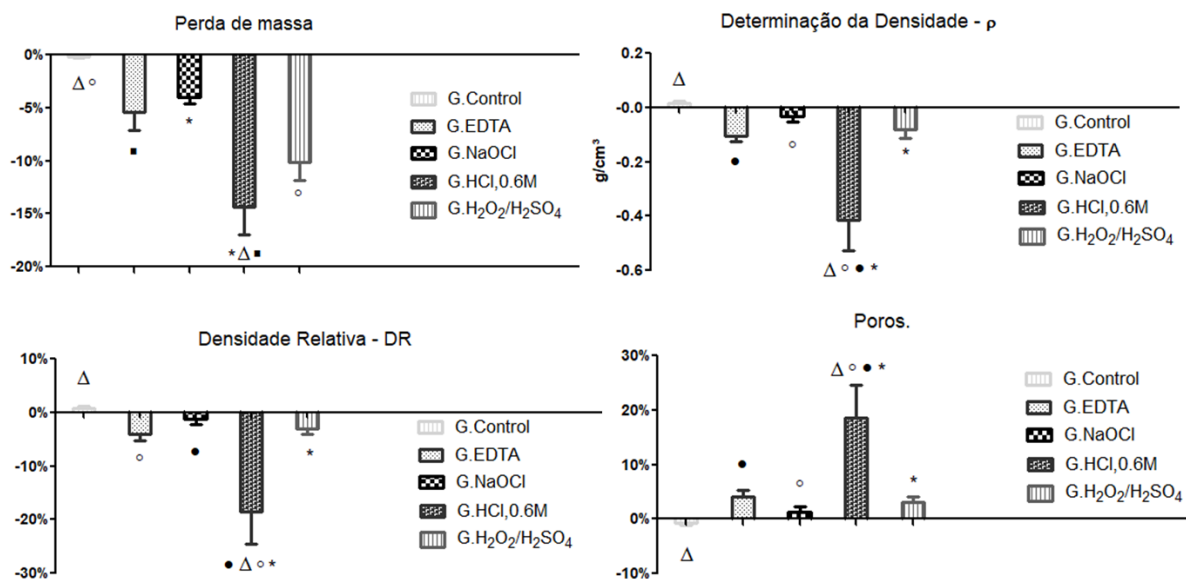
Já a diferença da determinação da densidade (ρ) e Densidade Relativa (DR) entre os grupos demonstrou uma redução da ρ e da DR maior nos grupos G.HCl-0,6M ($\rho = - 0,42 \pm 0,19 \text{ g/cm}^3$, DR = $- 18,45 \pm 10,58 \%$), G.EDTA ($\rho = - 0,11 \pm 0,03$

g/cm³, DR = - 4,10 ± 1,94 %), G.H₂O₂/H₂SO₄ (ρ = - 0,08 ± 0,06 g/cm³, DR = - 3,10 ± 1,65 %) e G.NaOCl (ρ = - 0,03 ± 0,04 g/cm³, DR = - 1,31 ± 1,55 %), enquanto no G.Control (ρ = 0,01 ± 0,01 g/cm³, DR = 0,65 ± 0,74 %) a densidade permaneceu estável, o que era esperado. A diferença de Porosidade (Poros.) também seguiu o mesmo padrão dos grupos acima, revelando um ganho de porosidade nos grupos G.HCl-0,6M (Poros. 18,45 ± 10,58 %), G.EDTA (Poros. 4,10 ± 1,94 %), G.H₂O₂/H₂SO₄ (Poros. 3,10 ± 1,65 %) e G.NaOCl (Poros. 1,31 ± 1,55 %), enquanto no G.Control (Poros. -0,65 ± 0,74 %) a porosidade permaneceu estável, o que era esperado.

A ligeira variação nos valores de densidade, DR e porosidade do grupo controle não foi significativa, podendo ser considerada como um erro intrínseco ao método, o qual pode estar associado ao operador, à sensibilidade da balança analítica ou à hidratação das amostras. No caso do operador, as fontes de erro podem ser provenientes da etapa de remoção da água da superfície das amostras para a medida da massa úmida, a qual ocorre de maneira manual e depende da experiência do operador, ou do cálculo da densidade, DR e porosidade devido aos arredondamentos numéricos com a eliminação de casas decimais de menor significância. Em relação à sensibilidade da balança analítica, o erro pode estar associado às vibrações causadas por agentes externos, o que interfere em sua estabilidade. Além disso, pode haver certo grau de hidratação das amostras devido à imersão em água, o que causa um ganho de massa.

A comparação dos dados, entre os grupos, através da determinação da densidade pelo método Arquimedes (ρ , DR e Poros.) revelou uma diferença estatística entre: G.Control e G.HCl,0,6M; G.HCl,0,6M e G.H₂O₂/H₂SO₄; G.EDTA e G.HCl,0,6M; G.NaOCl e G.HCl-0,6M (Gráf. 1 e Apêndice 4).

Gráfico 1 – Média da perda de massa e determinação da densidade final, da densidade relativa final e da poros. final após os ensaios de desmineralização.



*■Δ◊° = Diferença estatística entre as amostras.

5.3 ANÁLISE MICROESTRUTURAL E MORFOLÓGICA

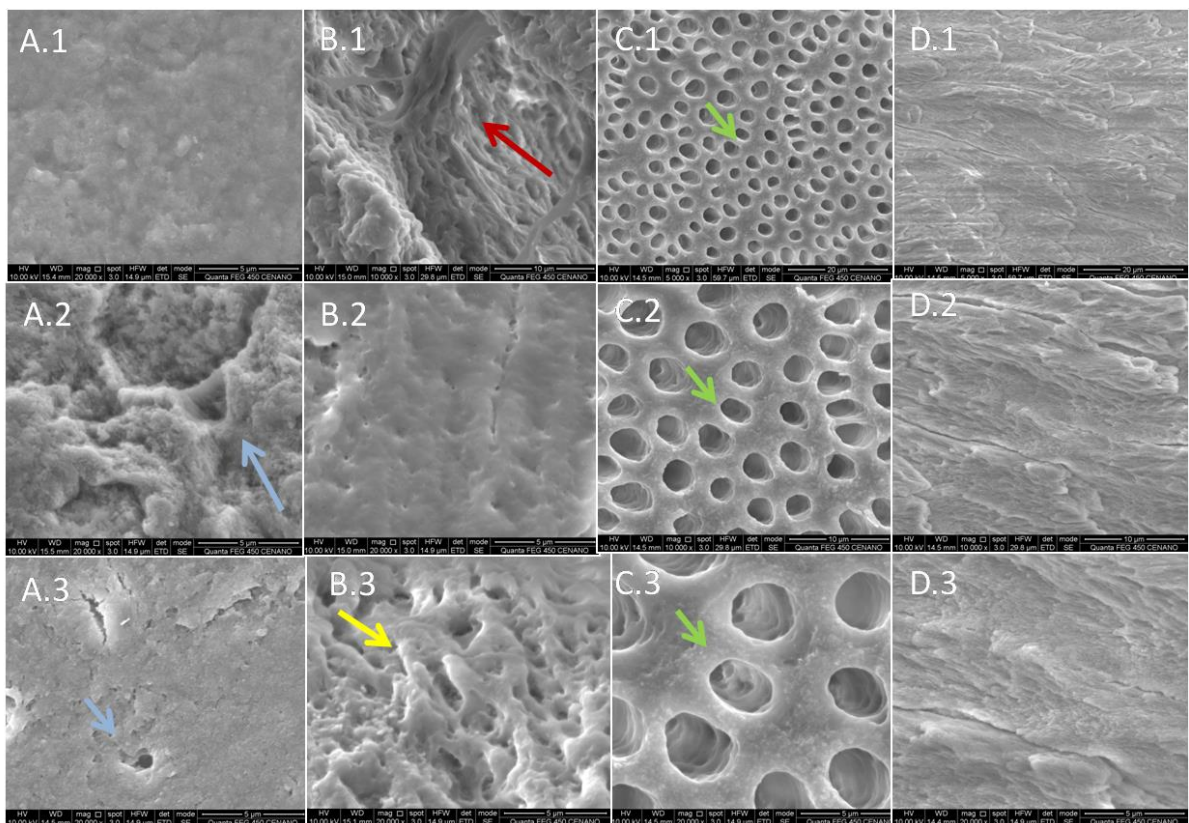
Os CPs originados da seção coronária foram analisados nas regiões de esmalte e dentina, enquanto os CPs da porção radicular, as varreduras ocorreram na porção dentinária. Inicialmente, foram analisados dois campos de varredura em cada amostra.

As imagens obtidas no MEV revelaram diferenças morfológicas na superfície do esmalte e da dentina entre os grupos.

No G.Control, as imagens A.1. A.2 e A.3 da Fig. 5 sugeriram a presença de uma intensa camada de *smear-layer*, permanecendo obliterada a embocadura dos canalículos dentinários do CP originado da seção coronária, enquanto na da seção radicular correspondente (Fig. 5 A.3) foi possível visualizar um limitado número de canalículos dentinários, parcialmente obstruídos. A superfície de todas as áreas apresentou uma morfologia rugosa e irregular, com *debris* (Fig. 5 A.1. A.2 e A.3 e

Apêndice 5). Já as imagens do G.EDTA sugeriram uma menor intensidade de *smear-layer* (Fig. 5 B.2) quando comparado com o G.Control (Fig. 5 A.2). Entretanto, em somente uma varredura de campo foi possível identificar uma superfície com exposição dos túbulos dentinários, sem a presença de *debris*, no CP originado da seção coronária (Fig. 5 C.1, C.2 e C.3), enquanto a região de esmalte apresentou a mesma morfologia do G.Control (Fig. 5 D.1, D.2 e D.3). O CP originado da porção radicular sugeriu uma superfície irregular recoberta com projeções e com túbulos dentinários parcialmente obliterados (Fig. 5 B.1, B.2 e B.3). Também foi possível identificar projeções interligando regiões, sugerindo a presença de feixes de colágeno remanescente (Fig. 5 B.1 e Apêndice 6).

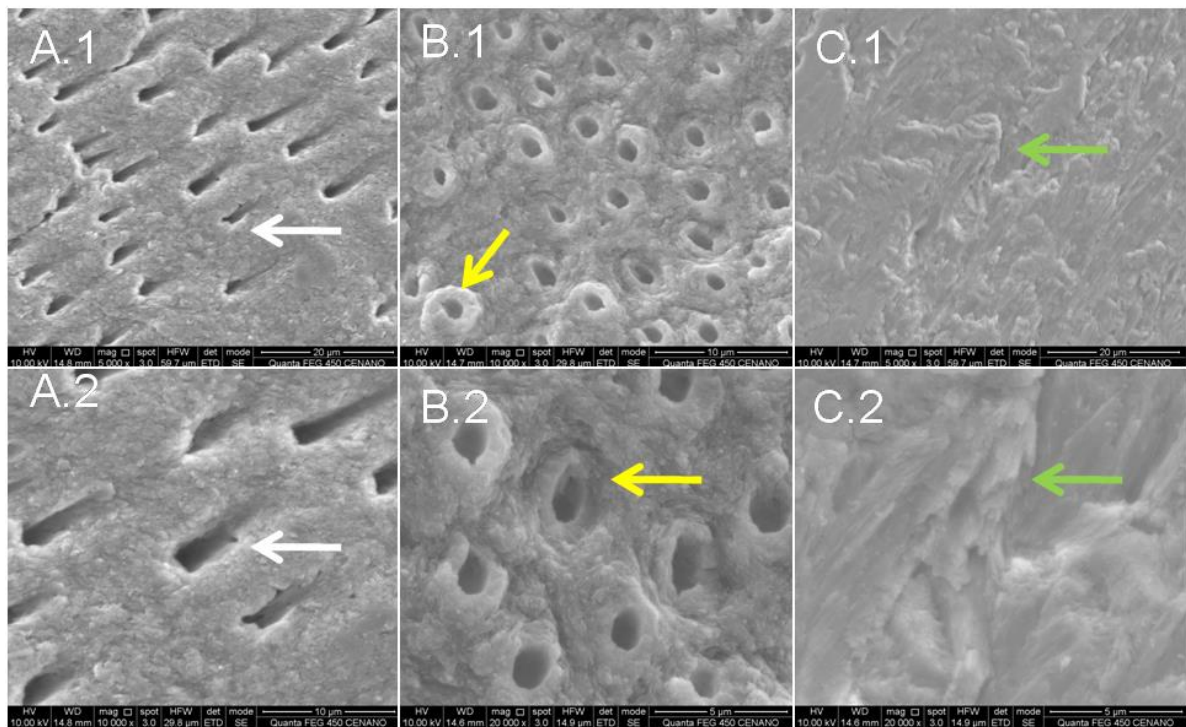
Figura 5 – Imagens MEV dos grupos G.Control e G,EDTA. Micrografias do G.Control demonstrando no esmalte uma superfície rugosa com *debris* (Imag. A.1) e na dentina, túbulos dentinários parcialmente obstruídos por *smear-layer* (Imag. A.2 e A.3, setas azuis). Fotomicrografias do G.EDTA sugerindo presença de fibras de colágeno (Imag. B.1, seta vermelha), camada superficial de *smear-layer* (Imag. B.2) e projeções sobre a superfície (Imag. B.3, seta amarela). Imagens da seção coronária do G.EDTA revelando túbulos dentinários desobstruídos (Imag. C.1 – C.3, setas verdes), enquanto na região de esmalte foi possível identificar uma superfície irregular e rugosa (Imag. D.1 – D.3).



Comparado com G.Control (Fig. 5 A.1 – A.3) e G.EDTA (Fig. 5 B.1-B.3, C.1-C.3 e D.1–D.3), o grupo G.NaOCl apresentou uma superfície com menor quantidade de *smear-layer* (Fig. 6 A1 e A.2), revelando túbulos dentinários ao longo de toda a superfície da seção radicular (Fig. 6 A1 e A.2) e coronária (Fig. 6 B1, B2, C1 e C.2).

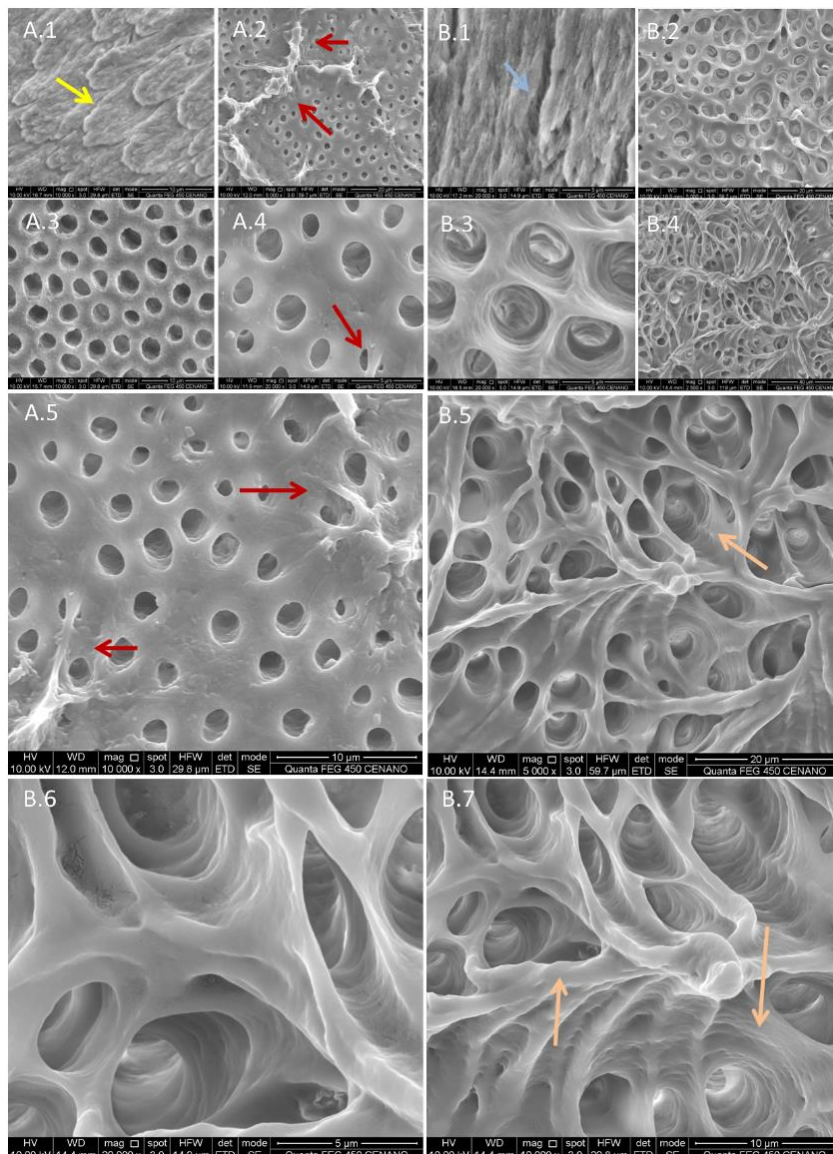
A dentina coronária apresentou uma descalcificação com halos peritubulares, margeando as embocaduras, sugerindo a presença de uma superfície irregular na dentina intertubular. As imagens ainda sugeriram haver projeções dos túbulos dentinários, protegidos por esta região peritubular. Já a região de esmalte dentinário apresentou uma superfície irregular (Fig. 6 C.1 e C.2), formada por áreas sugestivas de lamelas sobrepostas e livres de *smear-layer* (Fig. 6 C.1 e C.2 e Apêndice 7).

Figura 6 - Imagens MEV do grupo G.NaOCl. Imagens da seção radicular revelando túbulos dentinários desobstruídos (Imag. A.1 e A.2, setas brancas), enquanto na seção coronária foi possível identificar uma superfície com túbulos dentinários expostos circundados por uma região peritubular projetada, acima da superfície dentinária (Imag. B.1 e B.2, setas amarelas). A região de esmalte apresentando áreas sugestivas de lamelas sobrepostas (Imag. C.1 e C.2, setas verdes).



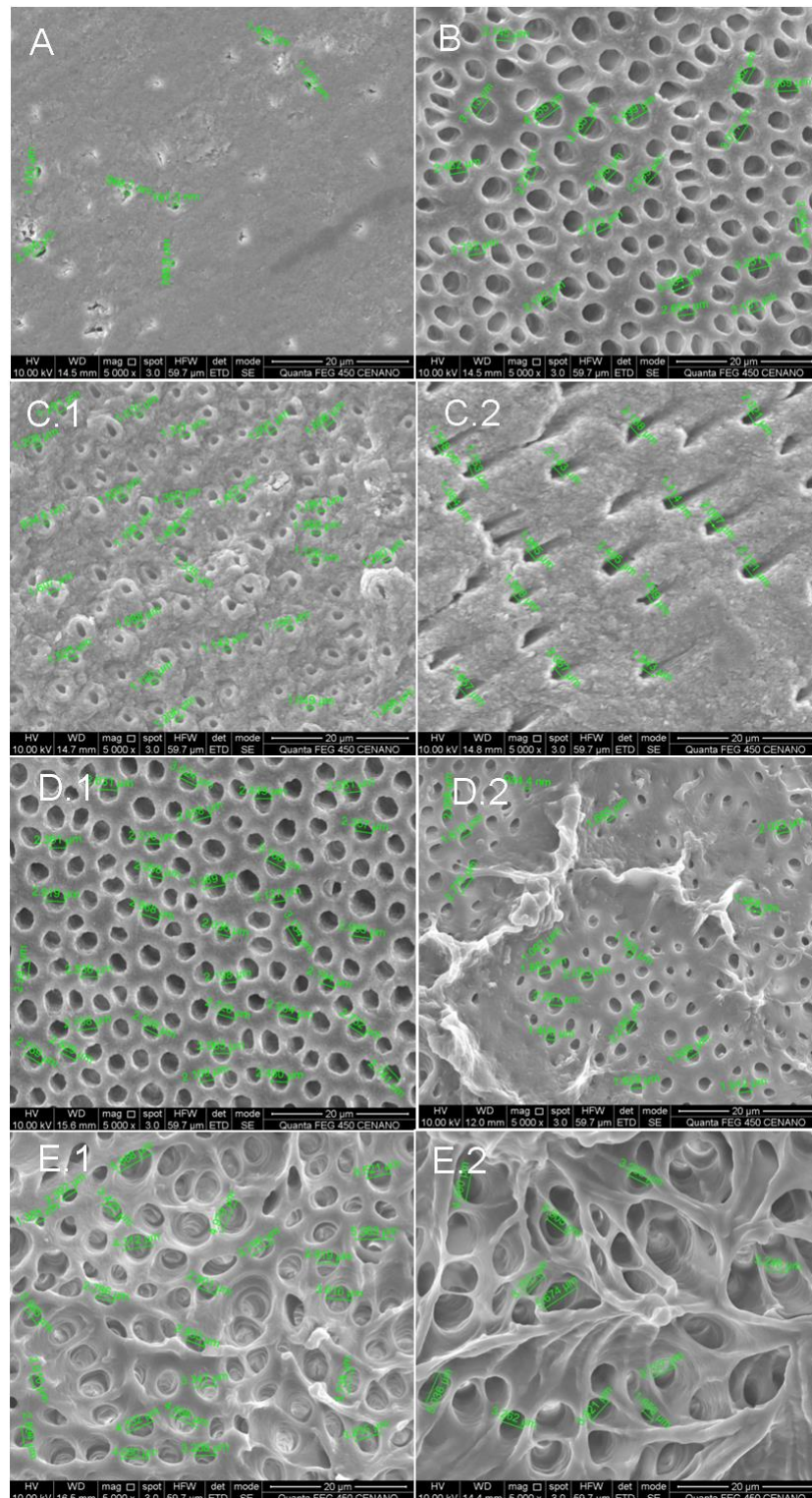
Dentre os grupos analisados, G.HCl-0,6M (Fig. 7 A1-A.5) e G.H₂O₂/H₂SO₄ (Fig. 7 B1-B7) foram os que apresentaram imagens sugestivas de maior desmineralização, a qual é caracterizada pela exposição dos túbulos dentinários. Em ambos os grupos não foi identificada a presença de *smear-layer* sobre a superfície, os túbulos dentinários apresentaram-se completamente expostos e a camada de esmalte apresentou uma desmineralização intensa, de sobrecamadas, como lamelas sobrepostas (Fig. 7 A.1 e B.1). No G.HCl-0,6M ainda foi possível identificar áreas com feixes interligados, sugestivos de colágeno, sobre a superfície dos CPs (Fig. 7 A.2 e Apêndice 8). Já o grupo G.H₂O₂/H₂SO₄ (Fig. 7 B2-B.7) revelou uma intensa desmineralização na superfície, quando comparado aos grupos G.Control, G.EDTA e G.HCl-0,6M, revelando túbulos dentinários expostos, abaixo do nível da superfície dentinária, com desmineralização intertubular. As imagens do grupo G.H₂O₂/H₂SO₄ (Fig. 7 B5-B7) se assemelharam a *scaffolds*, possuindo uma intensa porosidade inter e intratubular. As imagens sugeriram uma ação descalcificante no grupo G.H₂O₂/H₂SO₄ em profundidade, formando canais artificiais devido a porosidade (Fig. 7 B.5-B.7 e Apêndice 9). A região dentinária (Fig. 7 B5-B.7) demonstrou uma morfologia interconectada, composta de uma dentina descalcificada, similar a *scaffolds* de enxertos, com pontes dentinárias interligando regiões internas dos CPs. Houve uma evidente dilatação da região dos túbulos dentinários, sugerindo a formação de profundas áreas desmineralizadas (Fig. 7 B5-B.7 e Apêndice 9).

Figura 7 - Imagens MEV dos grupos G.HCl-0,6M e G.H₂O₂/H₂SO₄. Micrografias do grupo G.HCl-0,6M demonstrou na camada de esmalte uma superfície lamelar, em camadas (Imag. A.1, seta amarela), e na dentina, depósitos sugestivos de fibras colágenas (Imag. A.2, A.4 e A.5, setas vermelhas), enquanto outras regiões apresentavam uma superfície livre, com total exposição dos túbulos dentinários (Imag. A.3). Já o Grupo G.H₂O₂/H₂SO₄ demonstrou áreas de perda de esmalte (Imag. B1, seta azul) e a região dentinária demonstrou uma morfologia interconectada, composta de dentina descalcificada, similar a *scaffolds* de enxertos (Imag.B2-B7) com dilatação da região dos túbulos dentinários e imagens sugestivas de profundas áreas desmineralizadas (Imag. B.5 e B.7, setas laranjas).



A análise microestrutural e morfológica foi complementada com medições randomizadas dos diâmetros das embocaduras dos túbulos dentinários, nos diferentes grupos, em magnificação de 5000x (Fig. 8). As medições foram realizadas somente em 1 campo de cada CP, revelando os maiores diâmetros dos túbulos dentinários no grupo G.H₂O₂/H₂SO₄, seção radicular (Fig. 8 E.1, média: 3,82 ± 0,98 μm) e coronária (Fig. 8 E.2, média: 3,54 ± 0,99 μm), seguido pelos grupos G.EDTA, seção coronária (Fig. 8 B, média: 2,81 ± 0,52 μm); G.HCl-0,6M, seção coronária (Fig. 8 D.1, média: 2,61 ± 0,35 μm); G.NaOCl, seção radicular (Fig. 8 C.2, média: 1,87 ± 0,34 μm); G.HCl-0,6M, seção radicular (Fig. 8 D.2, média: 1,83 ± 0,46 μm); G.NaOCl, seção coronária (Fig. 8 C.1, média: 1,27 ± 0,19 μm) e G.Control, seção radicular (Fig. 8 A, média: 1,24 ± 0,50 μm).

Figura 8 – Diâmetro dos túbulos dentinários. Fotomicrografia dos grupos: G.Control, seção radicular (Imag. A); G.EDTA, seção coronária (Imag. B); G.NaOCl, seção coronária (Imag. C.1) e radicular (Imag. C.2); G.HCl-0,6M, seção coronária (Imag. D.1) e radicular (Imag. D.2) e G.H₂O₂/H₂SO₄, seção radicular (Imag. E.1) e coronária (Imag. E.2).

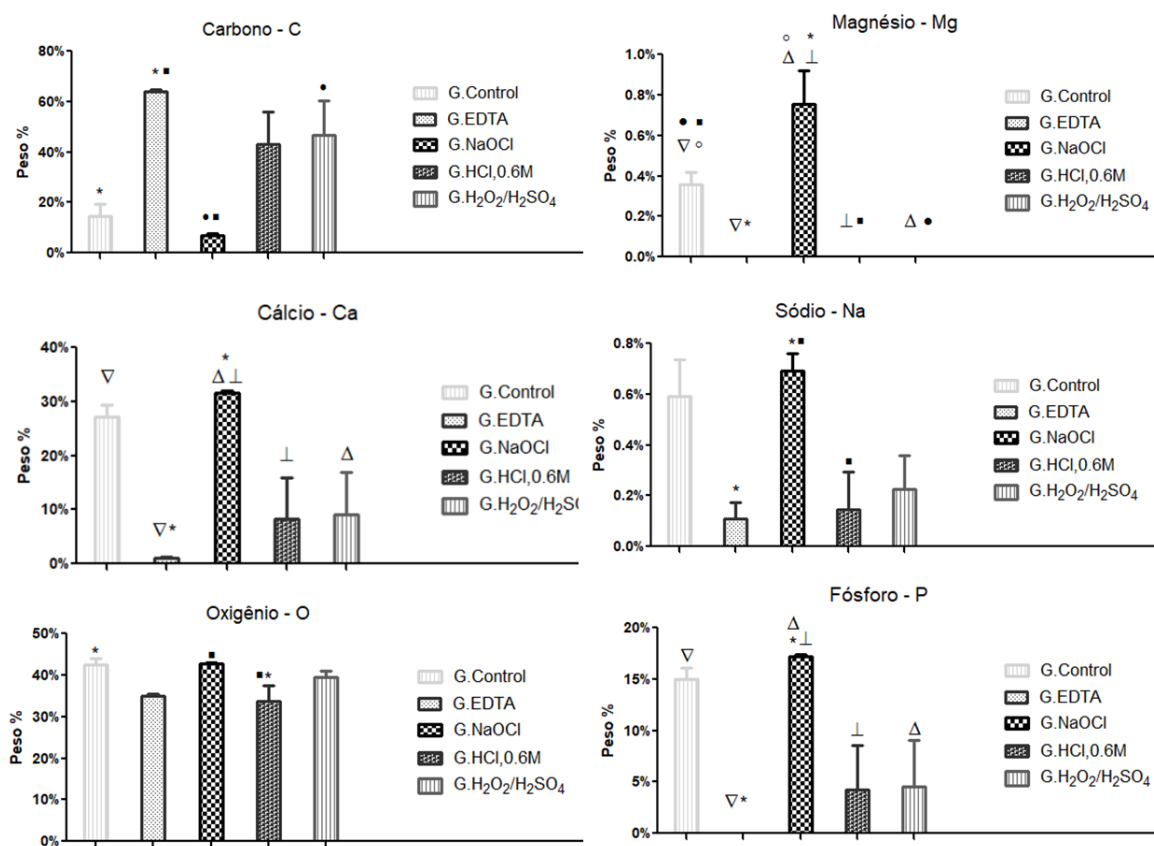


5.3.1 Espectrometria de energia dispersiva de Raios X

A Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x, uma técnica de microanálise, possibilitou a imediata identificação dos elementos químicos, presentes na superfície das DDMs. Através do espectro de energia, foi demonstrada a contagem relativa dos elementos químicos obtidos na análise da superfície, com poder de penetração de 1 μm do feixe de elétrons, determinando assim qualitativa e semi-quantitativamente os elementos químicos presentes (GEESEY *et al.*, 2002; OUNSI *et al.*, 2008) (Apêndice 10).

Corroborando com a análise das imagens no MEV, os espectros revelados no MEV-EDS indicaram diferenças significantes nas concentrações de fósforo (P) e Cálcio (Ca) entre os grupos: G-EDTA e G.Control; G-EDTA e G.NaOCl; G.NaOCl e G.H₂O₂/H₂SO₄ e G.NaOCl e G.HCl-0,6M (Gráf. 2), sugerindo um maior potencial desmineralizador do G-EDTA, G.H₂O₂/H₂SO₄ seguido pelo G.HCl-0,6M. Estes mesmos grupos, apresentaram os menores níveis de sódio (Na) e oxigênio (O), o que pode ser respondido em parte, pela ação do NaOCl sobre a matriz dentinária, permanecendo elementos residuais sobre a DDM. Em adição, não foi identificada a presença de magnésio (Mg) nos grupos G-EDTA, G.NaOCl e G.H₂O₂/H₂SO₄, enquanto nos grupos G.Control e G.NaOCl foram identificados elevados percentuais deste elemento.

Gráfico 2 - Análise química por espectrometria de energia dispersiva de Raios-x. Análise dos espectros identificados nas superfícies dos grupos após a ação das diferentes soluções desmineralizadoras.



*■Δ°⊥ = Diferença estatística entre as amostras.

A elevada perda, em associação, de P, Ca, Mg e Na nos grupos G-EDTA, G.H₂O₂/H₂SO₄ e G.HCl-0.6M possibilitou a formação de matrizes compostas de altos níveis de Carbono (C) (Gráf. 2). A presença de C foi significativamente elevada nos grupos G-EDTA, G.H₂O₂/H₂SO₄ e G.HCl-0,6M, sugerindo uma matriz descalcificada. Entretanto, a análise do G.H₂O₂/H₂SO₄ e G.HCl-0,6M evidenciou uma composição diversificada de O, C, P e Ca, com reduzidos níveis de Na, enquanto a composição das DDM processadas no grupo G-EDTA ficou limitada a uma matriz de O e C, com reduzidos níveis de Ca e Na.

6. DISCUSSÃO

A engenharia tecidual objetiva reparar ou regenerar os tecidos perdidos ou danificados através da combinação de *scaffolds* de biomateriais, células e fatores de crescimento (Qazi *et al.*, 2015). Alguns biomateriais possuem a função de matriz criando condições microambientais ideais para as células locais, como um arcabouço para orientar a reorganização dos tecidos (Qazi *et al.*, 2015). Os *scaffolds* servirão como um sistema transitório, sendo substituído pelo tecido local, ao longo do tempo, por degradação ou reabsorção (Abdollahiyan *et al.*, 2021). Mais além, os biomateriais podem servir de veículos para transportar ou liberar fatores bioativos de forma controlada através da incorporação, de agentes bioativos, como proteínas e fatores de crescimento, permitindo assim a adesão e proliferação das células com posterior formação de matriz extracelular (Qazi *et al.*, 2015).

Em resposta do fato das células não possuírem a capacidade de crescimento 3D favorável, vem crescendo os estudos do crescimento celular *in vitro* em matrizes 3D (Tablesh *et al.*, 2019). Logo as investigações dos biomateriais na engenharia tecidual se firmam em diferentes campos como a estrutura geométrica, a forma física, as propriedades químicas e a biofuncionalidade (Qazi *et al.*, 2015).

A fim de proporcionar a resposta biológica desejada os *scaffolds* devem possuir como características desejáveis tais como: poros de interconexão em escala apropriada para permitir a integração do tecido e da vascularização; ser constituído de material biodegradável ou reabsorvível biologicamente; superfície favorável a fixação celular, diferenciação e proliferação; possuir propriedades mecânicas adequadas ao sitio de implantação e manuseio; não deve possuir resposta adversa; ser fabricado com variedades de forma e tamanhos (Limmahakhun & Yan, 2017; Tablesh *et al.*, 2019).

Andaimes de biomateriais são empregados no controle local orientando a regeneração do tecido através do direcionamento do comportamento celular de migração, diferenciação, manutenção de fenótipo e apoptose (Qazi *et al.*, 2015; Tablesh *et al.*, 2019). Formados em construções tridimensionais, os *scaffolds* podem ser de origem sintética ou natural, mimetizando as propriedades do tecido ou órgão a ser regenerado. Já a biodegradação dos *scaffolds* evita a consequente infecção associada à presença prolongada de materiais de corpo estranho, possibilita a remodelação do tecido e a degradação, à medida que um novo tecido é formado enquanto o biomaterial é substituído e incorporado (Qazi *et al.*, 2015).

A disponibilidade limitada, dos aloenxertos e dos autoenxertos, nos pacientes, evidencia a necessidade de desenvolver novos conceitos para o desenvolvimento de tecidos alternativos, a fim de corrigir os defeitos teciduais (Abdollahiyan *et al.*, 2021). No intuito de expandir novas estratégias de tratamento para o ganho ósseo diferentes artigos indicaram a importância da DDM como um material de implante osteoindutor, apresentando vantagens como a relação custo / benefício, potencial osteoindutivo e propriedades quimiotáticas, atraindo células osteoprogenitoras e osteoblastos em direção a sua região, promovendo a aceleração do processo de reparo ósseo em defeitos ósseos cirúrgicos produzidos em osso parietal de coelhos (Gomes *et al.*, 2001).

6.1 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE PELO MÉTODO ARQUIMEDES

A resistência mecânica e a funcionalidade biológica são influenciadas pelas arquiteturas características do *scaffolds*, incluindo o tamanho de poro, porosidade, interconectividade, relação de superfície área/volume (Ho & Hutmacher, 2006). A alta porosidade é uma das características necessárias para uma celularidade uniforme, possibilitando a fixação e a neoformação tecidual, atuando

como vasos artificiais na transmissão de moléculas e células (Ho & Hutmacher, 2006; Abdollahiyan *et al.*, 2021). Uma porosidade ideal seria a de 90%, possibilitando o transporte difusivo das células dentro do *scaffolds*. Entretanto uma porosidade tão alta poderia comprometer as propriedades mecânicas deste *scaffold* (Ho & Hutmacher, 2006). Nos grupos estudados a maior porosidade final foi encontrada nos 3 CPs do G.HCl-0,6M, com porosidade final de 45,48 %, 27,12 % e 31,74 % (Apêndice 4).

Tais dados evidenciarão que a metodologia para a desmineralização das DDMs deve ser aprimorada, a fim de alcançar uma maior porosidade, possibilitando assim o desenvolvimento de um biomaterial eficiente através da técnica da DDM. Entretanto, cabe ponderar que as DDMs não seriam *scaffolds* tradicionais compostos de Hidrogéis, polímeros, biocerâmicas ou de hidroxiapatitas tratadas laboratorialmente. A grande maioria dos artigos que abordaram a porosidade focam nestes biomateriais (Ho & Hutmacher, 2006; Abdollahiyan *et al.*, 2021) e mesmo com os parâmetros ideais, após o período de substituição, estes biomateriais tendem a fraturar devido a sua fragilidade (Limmahakhun & Yan, 2017).

Os dados de porosidade encontrados nas DDMs desenvolvidas são comparáveis as porosidades de *scaffolds* metálicos desenvolvidos em impressoras 3D, variando entre 40% e 70% (Limmahakhun & Yan, 2017). O melhor enquadramento para as DDMs estaria apoiado no trabalho de Limmahakhun & Yan (2017), quando conceituaram a “gradação de *scaffolds* ósseos”, desenvolvidos por métodos aditivos 3D ou convencionais. Neste conceito, uma estrutura funcionalmente graduada, possuindo porosidades distintas é correlacionada a um gradiente específico de espaço no *scaffold*. Esta arquitetura seria superior as demais arquiteturas, por favorecer o controle físico e mecânico necessário em áreas sob

stress fisiológico (Limmahakhun & Yan, 2017). Logo, biomateriais funcionalmente graduados poderiam fornecer resistência para os implantes suportarem a carga fisiológica, enquanto uma porosidade graduada otimiza a resposta do biomaterial ao carregamento externo (Limmahakhun & Yan, 2017).

Ao analisar as trabéculas ósseas e o osso cortical, são encontrados relatos de porosidade de 5% e 10% (Abdollahiyan *et al.*, 2021), ficando abaixo da porosidade final de todas as amostras estudadas, mesmo ao comparar com a menor porosidade final encontrada do grupo G.H₂O₂/H₂SO₄, poros. 13,64%. Já *scaffolds* com porosidades graduadas entre 40 e 70% demonstraram módulos de elasticidade similares a rigidez óssea (Limmahakhun & Yan, 2017). Enquanto, *scaffolds* com uma porosidade graduada permitiram a formação de quantidades de osso ligeiramente maiores quando comparados a *scaffolds* com porosidades homogêneas (Limmahakhun & Yan, 2017).

A metodologia empregada para o desenvolvimento das DDMs utilizando o emprego associado das soluções desmineralizantes com elevação de temperatura e sonicação potencializou a ação química, acarretando em *scaffolds* de diferentes porosidades. Entretanto, tais fatos, devem ser modulados, a fim de alcançar melhores parâmetros de porosidade final, potencializando a reação cinética entre as soluções e as DDMs. Porém, vale ressaltar que este estudo evidenciou que as soluções empregadas nos grupos G.HCl-0,6M, G.H₂O₂/H₂SO₄ e G.EDTA apresentaram resultados promissores ao comparar com G.Control e G.NOCl.

6.2 ANÁLISES NO MEV

Para a reconstrução cirúrgica, um *scaffold* poroso, com uma porosidade aberta, facilita a circulação de fluidos biológicos, possibilitando a fixação celular para

a neoformação tecidual (WERS *et al.*, 2015). As respostas celulares e regenerativas do tecido dependem de diferentes características dos poros, tais como: quantidade, forma, tamanho e interconectividade (Limmahakhun & Yan, 2017; Abdollahiyan *et al.*, 2021). Estudos tem reportado que macroporos interconectados ($> 100 \mu\text{m}$) na faixa de 200-600 μm são os pré-requisitos para o crescimento ósseo, infiltração celular, transporte de nutrientes/excreções e promoção da endogênese capilar para apoiar a formação de tecido ósseo; e microporos na faixa de 0,5-20 μm favorecem a adesão e diferenciação celular (Murphy *et al.*, 2010; Hang Zhang *et al.*, 2021).

Apoiado nesses estudos, as amostras de todos os grupos estudados apresentaram tamanhos de microporos (0,74–4,80 μm) favoráveis à adesão e diferenciação celular. Entretanto, as DDMs desenvolvidas a partir dos grupos G-EDTA (Figs. 5 C.1-C.3), G.HCl-0,6M (Figs. 7 A.2-A.5) e G.H₂O₂/H₂SO₄ (Figs. 7 B.2-B.7) apresentaram características de microporosidade mais adequadas em termos de profundidade dos microporos para serem projetados como *scaffolds*. Sendo que, as amostras dos grupos G-EDTA (Figs. 5 C.1-C.3) e G.HCl-0,6M (Figs. 7 A.2-A.5) exibiram similaridade em relação à morfologia dos poros, ou seja, poros fechados e arredondados. Já as amostras do grupo G.H₂O₂/H₂SO₄ (Figs. 7 B.2-B.7) mostraram microporos interconectados, com partes da dentina peritubular sobre a superfície dentinária, sugerindo melhores estruturas de poros para aplicação em *scaffolds*, quando comparadas com as amostras dos grupos EDTA (Figs. 5 C.1-C.3) e G.HCl-0,6M (Figs. 7 A.2-A.5).

Murphy *et al.*, (2010) indicaram que poros médios de 164 μm e 190 μm demonstraram uma migração celular com progressão lenta, não atingindo o centro do *scaffold*, enquanto poros de 325 μm apresentaram uma maior taxa de infiltração celular associada a distribuição celular uniforme. Contrariamente, níveis mais altos de células foram encontrados em *scaffolds* com poros de 96 μm , indicando que a

adesão celular diminui com o aumento do tamanho dos poros (Murphy & O'Brien, 2010). Logo, a menor disponibilidade de área superficial específica, pelo aumento do tamanho dos poros, pode levar a redução de áreas de adesão celular (Murphy & O'Brien, 2010).

Considerando os dados acima, características de rugosidade e topografia também alteraram o comportamento celular (Calore *et al.*, 2021). Calore *et al.* (2021) e Abdollahiyan *et al.* (2021) indicaram que em ambiente osteogênico, as células estromais mesenquimais humanas e osteoblastos foram mais responsivas à rugosidade da superfície do que à rigidez da superfície de diferentes *scaffolds*. Correlacionando estas informações com as imagens obtidas no MEV, o grupo G.H₂O₂/H₂SO₄ exibiu o melhor perfil topográfico, por apresentar uma morfologia irregular com intensa porosidade inter e intratubular evidenciando as melhores características em relação aos demais grupos, uma vez que Ho & Hutmacher (2006) indicaram a eficiência na difusão das células em *scaffolds* com poros interconectados.

Os resultados das análises de EDS mostraram que a composição química final dos grupos de amostras é compatível com a estrutura química óssea normal. Abdollahiyan *et al.* (2021) relataram a constituição óssea sendo de cristais de hidroxiapatita - HA (fósforo e cálcio), cloro, sódio, magnésio, carbonato, flúor, potássio, bem como vestígios de estrôncio, zinco, silício e cobre, além de fibras de colágeno. A presença de Ca e P nos grupos G.H₂O₂/H₂SO₄ e o G.HCl-0,6M, após o processo de confecção das DDMs, sugeriu estes achados promissores em relação ao G.EDTA, que apresentou níveis inferiores de Ca e nulos de P, uma vez que a presença Hidroxiapatita, composta principalmente por Ca e P, aumenta as propriedades mecânicas e potencializa a capacidade de adesão dos osteoblastos em Scaffolds (Abdollahiyan *et al.*, 2021).

Anteriormente, Kuntze *et al.* (2020) identificaram, através do EDS, padrões similares de Ca e P em amostras desmineralizadas com HCl 6,0 M e 12 M, demonstrando maiores percentuais de Ca e P, corroborando com os achados reportados neste estudo.

7. CONCLUSÃO

A metodologia empregada para o desenvolvimento das DDMs associando soluções desmineralizantes com elevação de temperatura e sonicação potencializou a ação química, acarretando *scaffolds* de diferentes porosidades. Entretanto, através do emprego da determinação da densidade pelo método Arquimedes foi possível identificar o melhor potencial desmineralizante nas soluções de HCl-0,6M, H₂O₂/H₂SO₄ e EDTA, acarretando características de microporosidade mais adequadas em termos de profundidade dos microporos para serem projetados como *scaffolds*.

A presença de uma matriz composta de Ca e P nos grupos G.H₂O₂/H₂SO₄ e o G.HCl-0,6M, após o processo de confecção das DDMs, permitiu sugerir a viabilidade no emprego de *scaffolds* de DDMs na técnica da regeneração óssea guiada por apresentar um perfil mineral similar ao perfil mineral ósseo.

Aprofundando-se nas análises, conclui-se que o emprego da solução de G.H₂O₂/H₂SO₄ permitiu a formação de microporos interconectados, sugerindo melhores estruturas de poros para aplicação em *scaffolds*, quando comparadas com as demais soluções estudadas.

Mesmo não alcançando o maior potencial desmineralizante, a solução de H₂O₂/H₂SO₄ permitiu desenvolver *scaffolds* com características químicas e superficiais de microporosidade diferenciadas que superam as outras soluções empregadas no desenvolvimento da DDMs, sendo determinada como a melhor solução para o emprego na técnica da DDM.

Estudos adicionais são necessários no desenvolvimento da técnica da DDM, a fim de correlacionar o potencial osteogênico e microestrutural.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alakpa, E.V.; Jayawarna, V.; Lampel, A.; Burgess, K.V.; West, C.C.; Bakker, S.C.J. *et al.* Tunable Supramolecular Hydrogels for Selection of Lineage-Guiding Metabolites in Stem Cell Cultures. *Chem.* 1(11): 298-319, 2016.
2. Bessho, K., Tagawa T.; Murata, M. Purification of rabbit bone Morphogenetic protein derived from Bone, Dentin, and wound Tissue after tooth extraction. *J oral maxillofac Surg.* 48, p.:162-9, 1990.
3. Catanzaro-guimarães, S.A.; Catanzaro-guimarães B.P.N.; Garcia, R.B.; Allen N. Osteogenic potential of autogenic demineralized implanted in bony defects in dogs. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 15: 160-169, 1986.
4. De carvalho P S P, Ponzoni D, Bassi A P F, De carvalho M C A. Alveolar process volume maintenance after exodontia with autogenous cortical bone scrapes. Case report. *Implant News.* 2004;1(1):53-8.
5. Dos Reis Lobato, B. Estudo piloto prospectivo – serie de casos de avaliação da regeneração óssea através da utilização de um particulado de dentina autógena. Dissertação. Mestrado e medicina veterinária, instituto superior de ciências da saúde Egas Moniz. 2016.
6. GEESEY, G. G.; NEAL, A. L.; SUCI, P. A. *et al.* A review of spectroscopic methods for characterizing microbial transformations of minerals. *Journal of microbiological methods*, 51: 125-39; 2002.
7. Gomes, M.F.; Dos Anjos, M.J.S.; Nogueira, T.O.; Ginmaaes S.A.C. Histologic Evaluation of the Osteoinductive Property of Autogenous Demineralized Dentin Matrix on Surgical Bone Defects in Rabbit Skulls Using Human Amniotic Membrane for Guided Bone Regeneration. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 16(4): 563-71, 2001.
8. Ho ST.; Hutmacher DW. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*, 27: 1362-76, 2006.
9. Huggins, C.; Wiseman, S.; Reddi, A.H. Transformation of fibroblast by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. *The Journal of experimental medicine*, 132(6), p. 1250-1258, 1970.

10. Janicki, P.; Schmidmaier, G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, 42: S77-S81, 2011.
11. Joshi C.; D'Lima C.; Karde P.; Mamajiwala A. Ridge augmentation using sticky bone: A combination of human tooth allograft and autologous fibrin glue. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 23 (5):493-6, 2019.
12. Kim YK, Kim SG, Byeon JH, Lee HJ, Um IU, Lim SC. Development of a novel bone grafting material using autogenous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*;109:496-503, 2010.
13. Kim, Y.; Kim S.; Yun, P.; Yeo, I.; Jin, S.; Oh, J. et al. Autogenous teeth used for bone grafting: a comparison with traditional grafting materials. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 117(1):e39-e45, 2014
14. Kim, Y.K.; Kim, S.G.; Um, I.W.; Kim, K.W. Bone Grafts using autogenous tooth blocks: A case series. *Implant Dentistry*, 22 (6), p: 584-9, 2013.
15. Lemos, S. B. Autogenous bone graft with teeth: a literature review. *BJHS*, 1(5): p. 101-18, 2019.
16. Murata, M.; Sato, D.; Hino, J.; Akazawa, T.; Tazaki, J.; Ito, K.; Arisue, M. Acid-insoluble human dentin as Carrier material for recombinant human BMP-2. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100A(3), 2012.
17. OUNSI, H. E.; AL-SHALAN, T.; SALAMED, Z. *et al.* Quantitative and qualitative elemental analysis of different nickel-titanium rotary instruments by using scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. *JOE*, 34(1):53-5, 2008.
18. PARK, Chang Soo; LEE, Yun Jin. Method for producing a bone transplant material, and bone transplant material produced by same. Depositante: PARK, Chang Soo; LEE, Yun Jin. KR EP2 641 622 A2. Depósito: 26 Set. 2011. Concessão: 25 Set. 2013.
19. Park, S.; Um, I.; Kim, Y.; Kim, K. Clinical application of auto-tooth bone graft material. *J Koran Assoc Orla Maxillofac Surg*, 38: 2-8, 2012.
20. Pinto L P, Brosco H B, Taga R, Taga E M. Regeneração óssea guiada de alvéolos de extração dentária: por quê fazê-las. *Revista Brasileira de Implantodontia*. 2000; jul/set: 9-12.

21. Qazi, T.H.; Mooney, D.J.; Pumberger, M.; Geißler, S.; Duda, G.N. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends. *Biomaterials*. 53: 502-21, 2015.
22. Sampath, T.K.; Reddi, A.H. Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, p.6591-5, 1983
23. Sheikh Z.; Sima C.; Glogauer M. Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation, *Materials* 2015, 8, 2953-2993; doi:10.3390/ma8062953
24. Tabatabaei, F.S.; Tatari, S.; Samadi, R.; Moharamzadeh, K. Different methods of dentin processing for application in bone tissue engineering: A systematic review. *Journal of biomedical materials research A*, 104A(10):2616-27, 2016.
25. Tabesh, H.; Amoabediny, G.H.; Saleni NiK, N.; Heydari, M.; Yosefifard, M.; Siadat, S.O.R.; Mottaghy, K. The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with schwann cells for spinal Cord regeneration. *Neurochemistry International*, 54: 73-83, 2009.
26. Vennat, E.; Bogicevic, C.; Fleureau, J.M.; Degrange, M. Desmineralized dentin 3D porosity and pore size distribution using Mercury porosimetry. *Dental materials*. 25, p. 729-35, 2009.
27. Wers, E., Lefeuvre, B., Pellen-Mussi, P., Novela, A., Oudadesse, H. New method of synthesis and in vitro studies of a porous biomaterial. *Materials Science and Engineering, C* 61: 133–142, 2016.
28. Yeomans J.D.; Urist M.R. Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. *Arch Oral Biol*. 12: 999-1008, 1967.
29. Wang Y., Gao M., Wang D, Sun L, Webster TJ. Nanoscale 3D Bioprinting for Osseous Tissue Manufacturing. *International Journal of Nanomedicine* 2020:15 215–226.
30. Calore, A.R.; Srinivas V.; Anand S.; Abillos-Sanches A., Looijmans S.F.S.P.; Van Breemen L.C.A.; et al. Shaping and properties of thermoplastic scaffolds in tissue regeneration: The effect of thermal history on polymer crystallization, surface characteristics and cell fate. *Journal of materials Research*, 36(19): 3914-35, 2021.
31. Ho ST.; Hutmacher DW. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*, 27: 1362-76, 2006.

32. Abdollahiyan P.; Oroojalina F.; Hejazi M.; De la Guardia M.; Mokhtarzadeh A. Nanotechnology, and scaffold implantation for the effective repair of injured organs: An overview on hard tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 333: 391–417, 2021.
33. Murphy CM.; Haugh MG.; O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 31: 461-466, 2010.
34. Murphy CM.; O'Brien FJ. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion & Migration*. 4(3): 377-381, 2010.
35. Limmahakhun, S & Yan C. Graded Cellular Bone Scaffolds. In: Bairo F (eds). *Scaffolds in Tissue Engineering - Materials, Technologies and Clinical Applications*. London: IntechOpen, 75-94, 2017.
36. Zhang, H.; Zhag, H.; Xiong, Y.; Dong, L.; Li, X.; Development of hierarchical porous bioceramic scaffolds with controlled micro/nano surface topography for accelerating bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 130: 112437, 2021.
37. ASTM B962-17. Standard Test Methods for Density of Compacted or Sintered Powder Metallurgy (PM) Products Using Archimedes' Principle. 2017.
38. Kuntze, M.M.; Souza, B.D.M.; Schmidt, T.F.; De Almeida, J.; Bortoluzzi, E.A.; Felipe, W.T. Scanning electron microscopy evaluation of dentin ultrastructure after surface demineralization. *J Conserv Dent*. 23(5): 512–517, 2020. doi: [10.4103/JCD.JCD_102_19](https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_102_19)

9. APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ENXERTOS E IMPLANTES PARA CIRURGIA DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA E MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA**

Pesquisador responsável: Fabiano Luiz Heggendorn, CRO-RJ: 29029

Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO) Campus I - Duque de Caxias. Rua Prof. José de Souza Herdy, 1.160, bloco C, 2º andar – 25 de Agosto – Duque de Caxias – Rio de Janeiro. CEP 25071-202

Nome	do	voluntário:
Idade:	_____ anos;	R.G.
Responsável	legal (quando for o caso):	
R.G.	Responsável	legal:

O Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa: “**PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ENXERTOS E IMPLANTES PARA CIRURGIA DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA E MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA**”, de responsabilidade dos pesquisadores Fabiano Luiz Heggendorn.

1- Este trabalho pretende pesquisar e desenvolver biomateriais desenvolvidos a partir de dentes humanos a serem utilizados como enxertos ósseos neste projeto.

2 – O dente doado ou fragmento ósseo será utilizado para avaliar a eficiência de biomateriais, enxertos ósseos. Os dentes obtidos serão armazenados em um biorepositório localizado no Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO) Campus I - Duque de Caxias, para outros ensaios que se façam necessários durante a pesquisa.

Também serão avaliados pequenos volumes sanguíneos através de venopunção para o estudo do desenvolvimento de biomateriais.

3 – Após a extração do dente/ bloco ósseo, este será preservado em solução salina ou água destilada, para posterior limpeza e remoção de tecidos e cálculos aderidos em sua estrutura.

4 – Espera-se que os benefícios desta pesquisa seja a produção de um enxerto ósseo autógeno aplicável imediatamente durante a cirurgia de cada paciente.

6 - Qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, dos resultados e/ou de assuntos relacionados à pesquisa será esclarecida pelos responsáveis pela pesquisa, a qualquer momento que o voluntário necessite. Podendo, ainda, retirar o consentimento de participação na pesquisa a qualquer momento não havendo penalidades, ou prejuízo de qualquer benefício adquirido ou no atendimento neste serviço.

7 - Não haverá custo financeiro para o voluntário desta pesquisa.

8 - A identidade do indivíduo e/ou responsável será mantida em sigilo.

9 - Os pesquisadores são obrigados a suspender a pesquisa imediatamente ao constar algum risco ou dano à minha saúde.

10 - Os resultados deste estudo serão divulgados em dissertação de mestrado, tese de doutorado, na literatura especializada, ou em congressos e eventos científicos.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na R. Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733, ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br.

Eu, _____,
RG. nº _____ declaro ter sido informado e concordo em participar,
como voluntário (a), do projeto de pesquisa acima descrito.

_____, _____ de _____ de

Assinatura do(a) paciente ou responsável legal
responsável por obter o consentimento

Assinatura do(a)

Testemunha

Testemunha

APÊNDICE 2 – Termo de doação.

TERMO DE DOAÇÃO

Título do Projeto: **PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ENXERTOS E IMPLANTES PARA CIRURGIA DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA E MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA.**

Pesquisador responsável: Fabiano Luiz Heggendorn, CRO-RJ: 29029

Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO) Campus I - Duque de Caxias. Rua Prof. José de Souza Herdy, 1.160, bloco C, 2º andar – 25 de Agosto – Duque de Caxias – Rio de Janeiro. CEP 25071-202

Eu, _____, portador do RG nº _____, com _____ anos, após ter recebido as informações que me foram transmitidas durante a elaboração do diagnóstico clínico e radiográfico do dente _____ e não tendo condição de receber tratamento conservador, e conseqüente permanência deste dente na cavidade bucal, CONSINTO NA REALIZAÇÃO DA (S) EXODONTIA (S), (extração) do (s) dente (s) _____, proposta (s), bem como a respectiva DOAÇÃO dos ORGÃOS EM QUESTÃO para a participação do projeto **“PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ENXERTOS E IMPLANTES PARA CIRURGIA DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA E MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA”**, preservando minha identidade.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do doador ou responsável

APÊNDICE 3 – Perda de Massa.

Dados de perda de massa dos grupos foram analisados.

Perda de Massa				
G.Control - Grupo controle, água.				
	Ma (g)	Md (g)	Md - Ma	Perda de Massa (%)
2C	1,0127	1,01	-0,0027	-0,27
2R	0,4169	0,4169	0	0
3R	0,5195	0,5163	-0,0032	-0,32
G.EDTA - Grupo EDTA				
	Ma (g)	Md (g)	Md - Ma	Perda de Massa (%)
3C	0,4033	0,3516	-0,0517	-5,17
4C	0,9562	0,8712	-0,085	-8,5
4R	0,2473	0,2218	-0,0255	-2,55
G.NaOCl - Grupo hipoclorito de sódio 2,5%				
	Ma (g)	Md (g)	Md - Ma	Perda de Massa (%)
5C	0,8188	0,7897	-0,0291	-2,91
5R	0,3857	0,3358	-0,0499	-4,99
7C	0,7723	0,7302	-0,0421	-4,21
G.HCl,0,6M - Grupo ácido clorídrico 0,6 M				
	Ma (g)	Md (g)	Md - Ma	Perda de Massa (%)
7R	0,2508	0,1483	-0,1025	-10,25
10C	0,5888	0,397	-0,1918	-19,18
10R	0,4692	0,3318	-0,1374	-13,74
G.H₂O₂/H₂SO₄ - Grupo ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio				
	Ma (g)	Md (g)	Md - Ma	Perda de Massa (%)
1R	0,2822	0,2145	-0,0677	-6,77
6R	0,4677	0,3546	-0,1131	-11,31
6C	0,4602	0,3374	-0,1228	-12,28

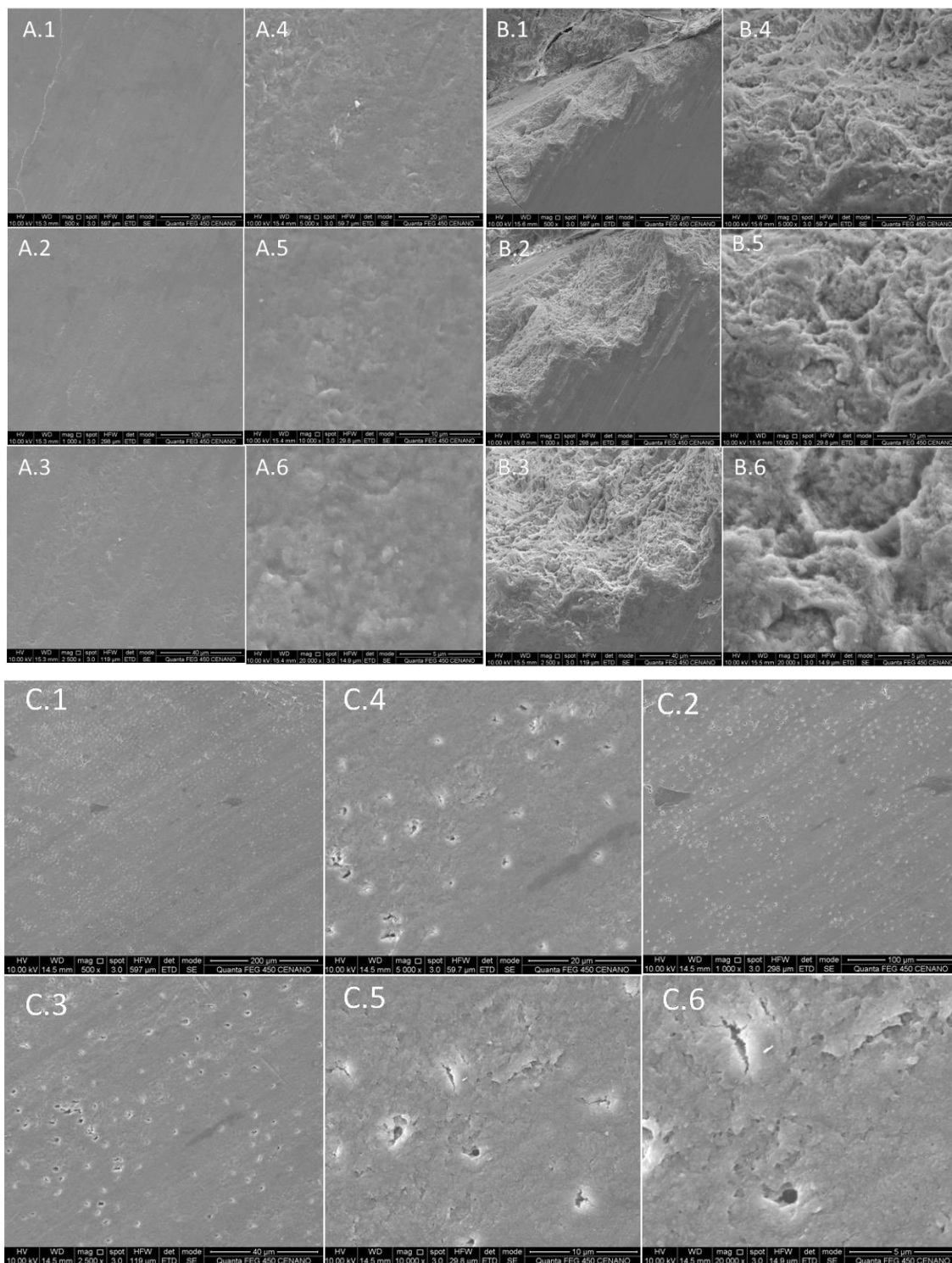
APÊNDICE 4 – Determinação da densidade pelo método Arquimedes.

Densidade - Método de Arquimedes

GRUPO ÁGUA (CONTROLE)												
Antes						Depois						
	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)
2C	1,0127	0,6343	1,0282	2,56273	85,424334	14,575666	1,01	0,6365	1,0299	2,559146	85,304864	14,695136
2R	0,4169	0,2255	0,4475	1,871919	87,47283	12,52717	0,4169	0,2252	0,4438	1,901033	88,83334	11,16666
3R	0,5195	0,2842	0,5562	1,903815	88,963304	11,036696	0,5163	0,2828	0,551	1,918896	89,668026	10,331974
GRUPO EDTA												
Antes						Depois						
	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)
3C	0,4033	0,2461	0,4135	2,40149	80,049669	19,950331	0,3516	0,2076	0,3577	2,334943	77,831419	22,168581
4C	0,9562	0,586	0,9559	2,508924	83,630794	16,369206	0,8712	0,5354	0,8988	2,389687	79,656225	20,343775
4R	0,2473	0,1317	0,2614	1,900606	88,81338	11,18662	0,2218	0,1176	0,2425	1,770138	82,71673	17,28327
GRUPO HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%												
Antes						Depois						
	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)
5C	0,8188	0,5003	0,8383	2,414733	80,491108	19,508892	0,7897	0,4938	0,8264	2,366726	78,890856	21,109144
5R	0,3857	0,2171	0,4228	1,869061	87,339279	12,660721	0,3358	0,195	0,3798	1,811285	84,639479	15,360521
7C	0,7723	0,4653	0,8076	2,248988	74,966271	25,033729	0,7302	0,4485	0,7706	2,259743	75,324781	24,675219
GRUPO ÁCIDO CLORÍDRICO 0,6 M												
Antes						Depois						
	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)
7R	0,2508	0,1351	0,2765	1,768016	82,617563	17,382437	0,1483	0,0671	0,1938	1,166736	54,52037	45,47963
10C	0,5888	0,3643	0,6088	2,400474	80,015793	19,984207	0,397	0,2342	0,4152	2,186351	72,878379	27,121621
10R	0,4692	0,2516	0,4989	1,891219	88,374739	11,625261	0,3318	0,1667	0,3931	1,460858	68,26439	31,73561
GRUPO ÁCIDO SULFÚRICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO												
Antes						Depois						
	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)	Ms (g)	Map (g)	Mu (g)	p (g/cm ³)	DR (%)	Poros. (%)
1R	0,2822	0,1595	0,3072	1,904516	88,996058	11,003942	0,2145	0,1197	0,2354	1,848	86,35514	13,64486
6R	0,4677	0,262	0,511	1,872303	87,490778	12,509222	0,3546	0,1991	0,3917	1,83523	85,758407	14,241593
6C	0,4602	0,2893	0,4763	2,453087	81,769583	18,230417	0,3374	0,2095	0,3554	2,305143	76,83809	23,16191

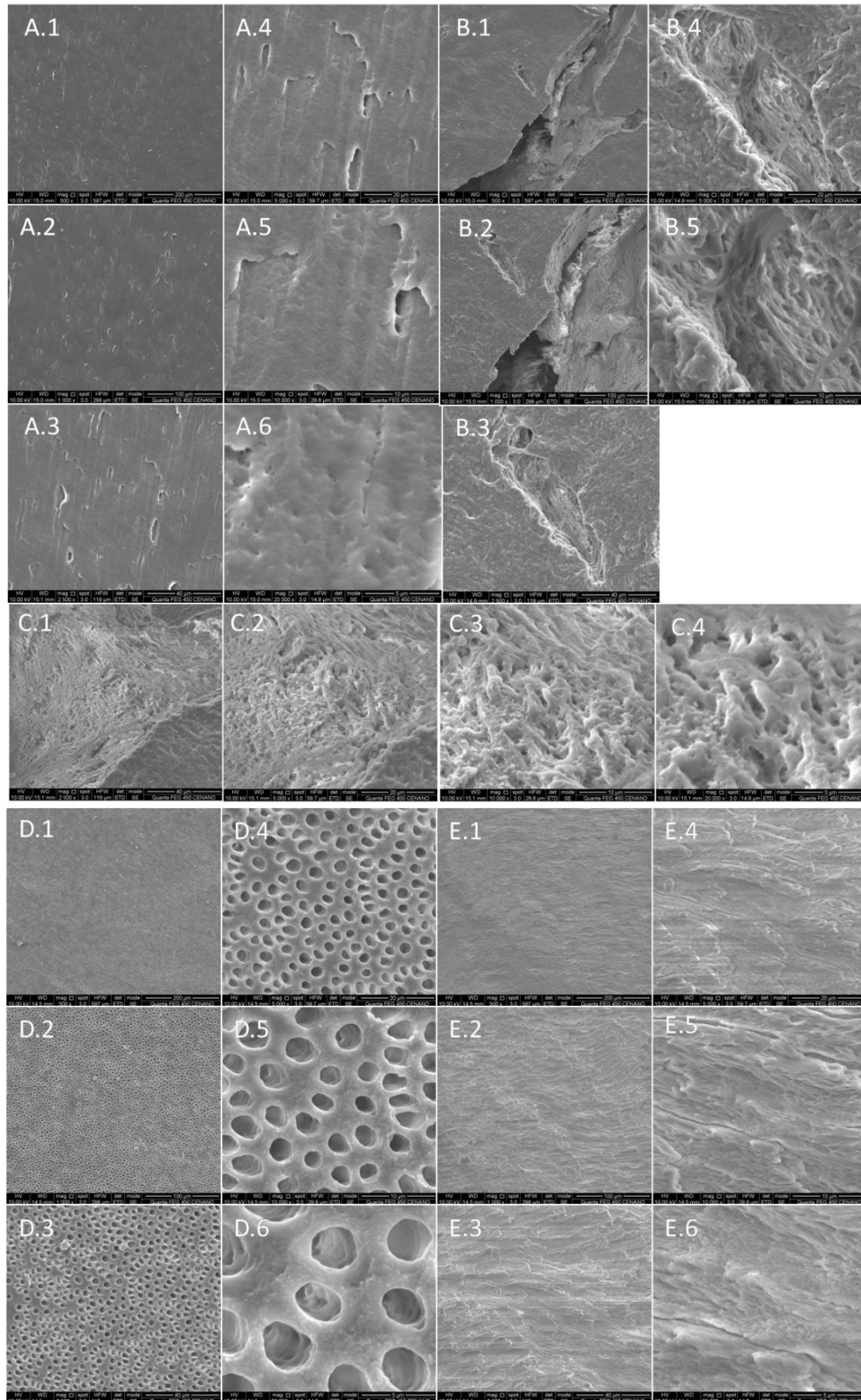
APÊNDICE 5 – Imagens MEV - G.Control.

Imagens do grupo controle, G.Control, em diferentes magnitudes. Varredura CP originado da seção coronária: área de esmalte (Imag. A.1 – A.6) e de dentina (Imag. B.1 – B.6). Varredura do CP originado da seção radicular: área de dentina (Imag. C.1 – C.6).



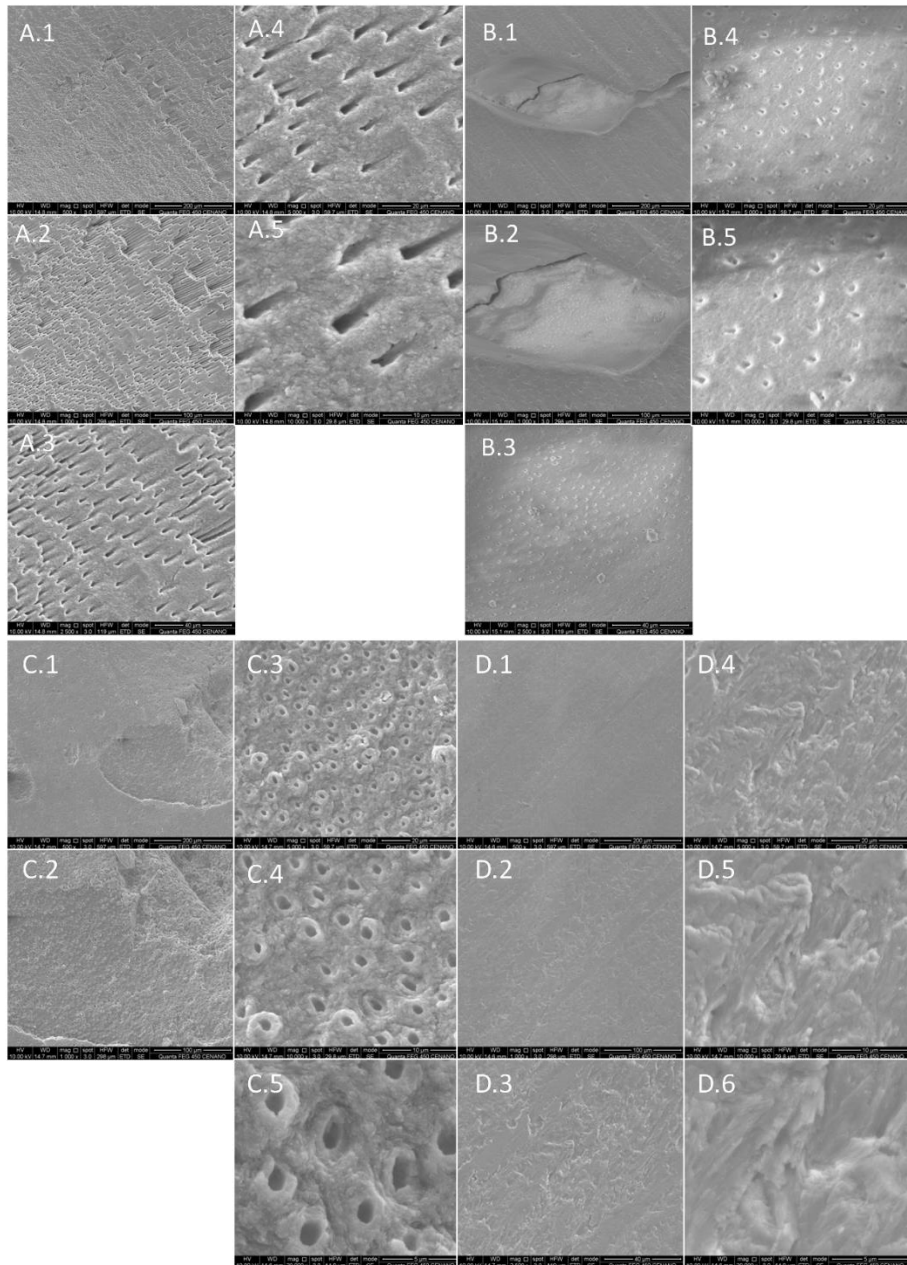
APÊNDICE 6 – Imagens MEV - G.EDTA.

Imagens do grupo EDTA, G.EDTA, em diferentes magnitudes. Varredura do CP originado da seção radicular: área de dentina (Imag. A.1 – A.6; B.1 – B.5 e C.1 – C.4). Varredura do CP originado da seção coronária: área de dentina (Imag. D.1 – D.6) e esmalte (Imag. E.1 – E.6).



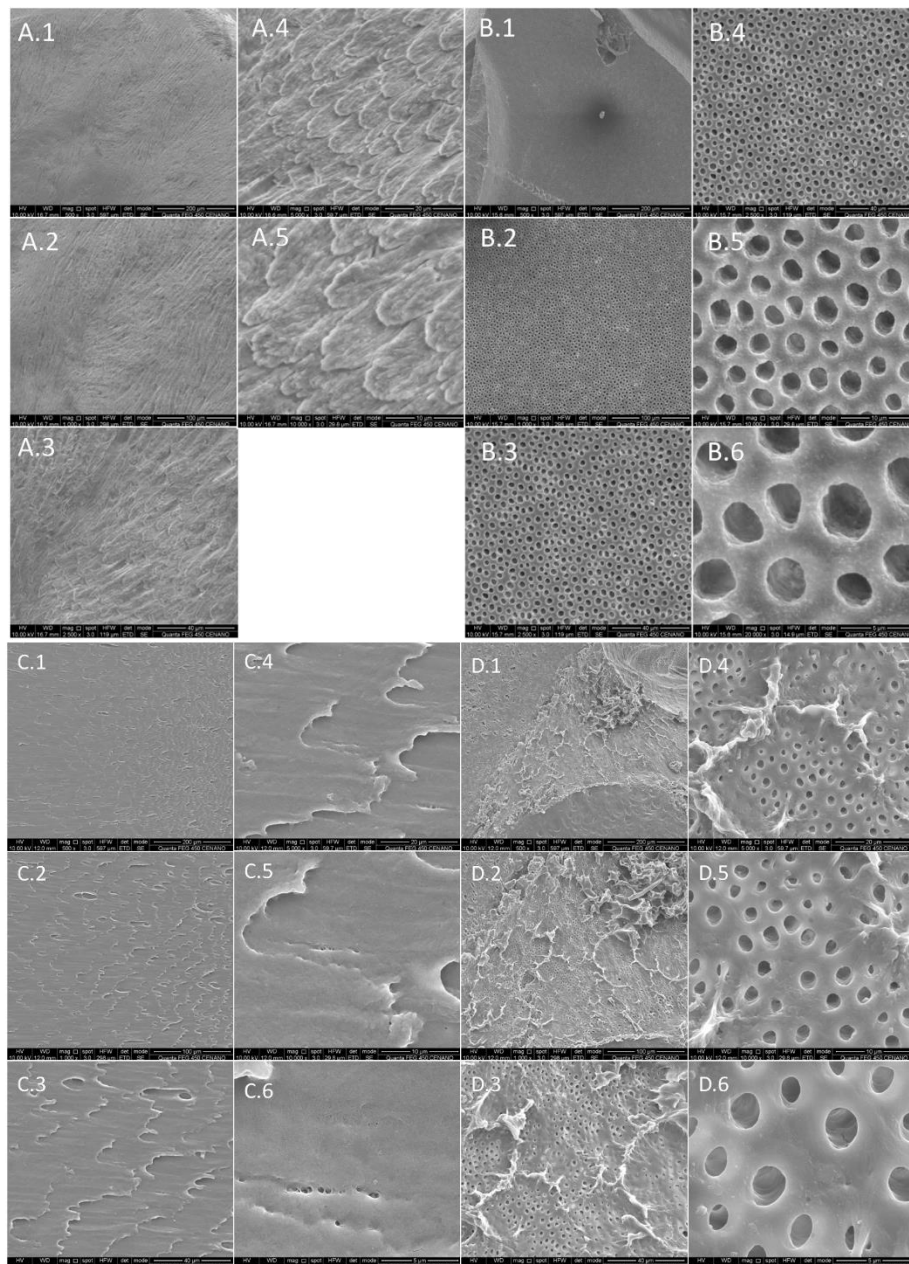
APÊNDICE 7 – Imagens MEV - G.NaOCl.

Imagens do grupo hipoclorito de sódio a 0.5%, G.NaOCl, em diferentes magnitudes. Varredura do CP originado da seção radicular: área de dentina (Imag. A.1 – A.5 e B.1 – B.5). Varredura do CP originado da seção coronária: área de dentina (Imag. C.1 – D.5) e esmalte (Imag. D.1 – D.6).



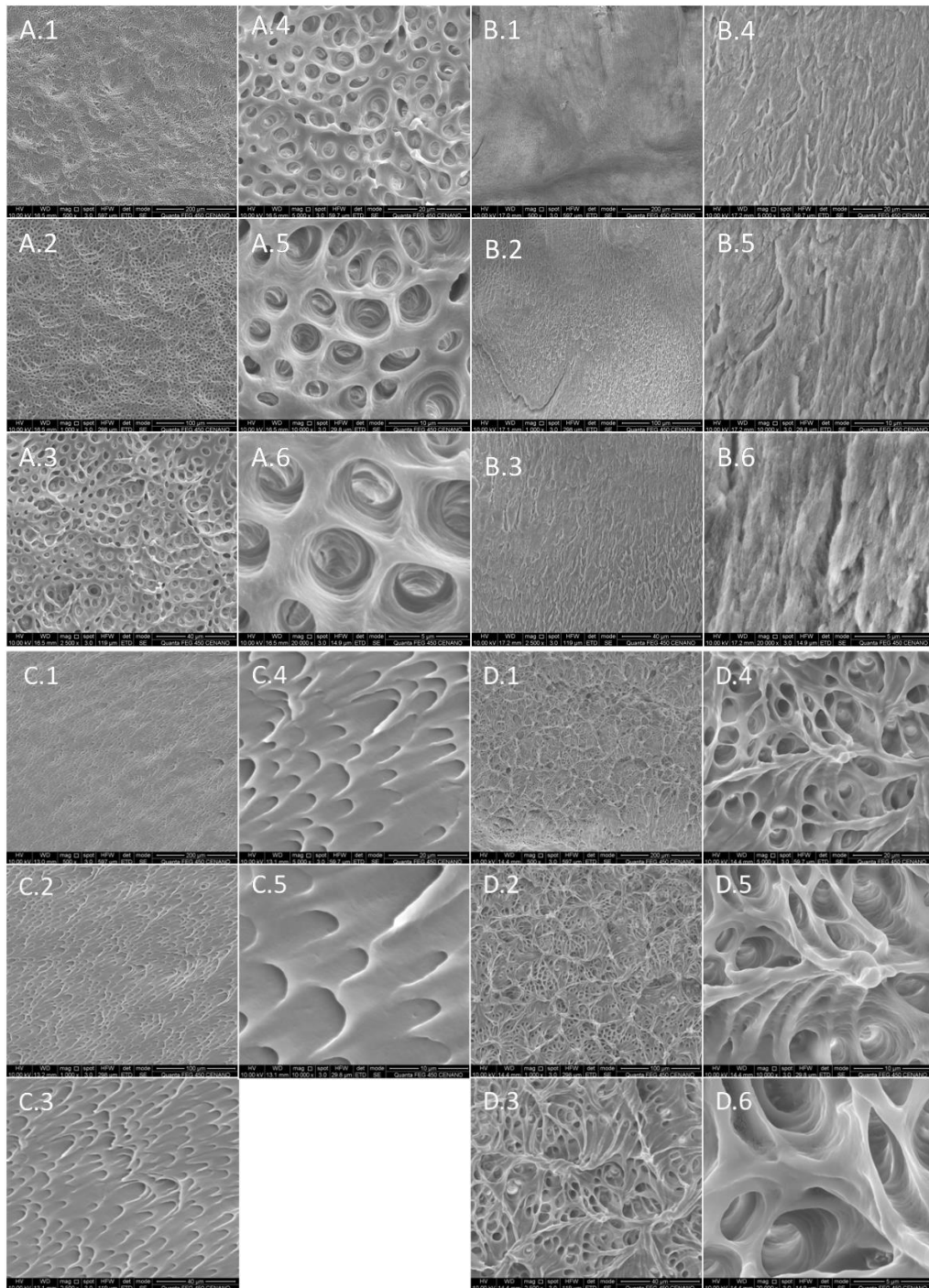
APÊNDICE 8 – Imagens MEV - G.HCl,0,6M.

Imagens do grupo ácido clorídrico 0,6M, G.HCl,0,6M, em diferentes magnitudes. Varredura do CP originado da seção coronária: área de dentina (Imag. A.1 – A.5) e de esmalte (Imag. B.1 – B.6). Varredura do CP originado da seção radicular: área de dentina (Imag. C.1 – C.6 e D.1 – D.6).



APÊNDICE 9 – Imagens MEV - G.H₂O₂/H₂SO₄

Imagens do grupo ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, G.H₂O₂/H₂SO₄, em diferentes magnitudes. Varredura do CP originado da seção coronária: área de dentina (Imag. A.1 – A.6) e de esmalte (Imag. B.1 – B.6). Varredura do CP originado da seção radicular: área de dentina (Imag. C.1 – C.5 e D.1 – D.6).



APÊNDICE 10 – Espectros do MEV-EDS

	C	O	Na	Mg	P	Ca	F	Cl	N
G.HCl,0,6M / Seção radicular	50.86%	28.79%							20.35%
G.HCl,0,6M / Seção radicular	50.53%	28.66%							20.82%
G.HCl,0,6M / Seção coronária - Esmalte	6.69%	44.12%	0.59%		17.07%	31.20%		0.34%	
G.HCl,0,6M / Seção coronária	64.66%	33.54%				1.80%			
G.H2O2/H2SO4 / Seção radicular	57.69%	40.86%				1.45%			
G.H2O2/H2SO4 / Seção radicular	59.58%	38.82%	0.44%			1.16%			
G.H2O2/H2SO4 / Seção coronária - Esmalte	6.07%	42.53%	0.47%		18.05%	32.35%		0.54%	
G.H2O2/H2SO4 / Seção coronária	63.63%	35.02%				1.35%			
G.NaOCl / Seção radicular	6.12%	43.14%	0.69%	0.87%	17.31%	31.87%			
G.NaOCl / Seção radicular	5.71%	42.70%	0.51%	1.01%	17.18%	31.65%	1.25%		
G.NaOCl / Seção coronária	6.15%	42.89%	0.80%	0.28%	17.84%	32.23%			
G.NaOCl / Seção coronária	9.73%	41.65%	0.77%	0.86%	16.71%	30.28%			
G.EDTA / Seção radicular	65.55%	34.00%				0.44%			
G.EDTA / Seção radicular	65.12%	34.33%				0.55%		0.45%	
G.EDTA / Seção coronária	63.30%	35.44%	0.26%			0.99%			
G.EDTA / Seção coronária	62.12%	35.78%	0.18%			1.93%			
G.Control / Seção radicular	24.98%	38.82%	0.34%	0.41%	12.65%	22.80%			
G.Control / Seção radicular	20.77%	40.50%	0.43%	0.48%	13.50%	24.32%			
G.Control / Seção coronária	5.91%	44.82%	0.60%	0.22%	17.10%	31.35%			
G.Control / Seção coronária	6.10%	45.44%	0.99%	0.33%	16.73%	30.41%			