MARCELA CHARANTOLA RODRIGUES

**Síntese e caracterização de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas com
TEGDMA e sua aplicação no desenvolvimento de
materiais resinosos remineralizadores**

São Paulo

2014

MARCELA CHARANTOLA RODRIGUES

**Síntese e caracterização de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas com
TEGDMA e sua aplicação no desenvolvimento de
materiais resinosos remineralizadores**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, para obter o
título de doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Biomateriais e Biologia
Oral

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rodrigues, Marcela Charantola.

Síntese e caracterização de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas com TEGDMA e sua aplicação no desenvolvimento de materiais resinosos remineralizadores / Marcela Charantola Rodrigues; orientador Roberto Ruggiero Braga. -- São Paulo, 2014.

92 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Biomateriais e Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Resinas compostas. 2. Biomateriais. 3. Fosfatos. 4. Íons. 5. Remineralização dentária. I. Braga, Roberto, Ruggiero. II. Título.

Rodrigues MC. Síntese e caracterização de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas com TEGDMA e sua aplicação no desenvolvimento de materiais resinosos remineralizadores. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a Deus, como forma de um singelo agradecimento por estar sempre comigo e por guiar meus caminhos até esta conquista.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço de modo muito especial à minha família, aos meus pais **José Mauro** e **Maria Lucia**, que sempre me apoiaram, cada um de sua forma, mas sempre me mostrando que devemos dar o melhor de si em todas as circunstâncias. A vocês que sempre cuidaram de mim e me deram oportunidade de chegar até aqui, muito obrigada. Aos meus irmãos **Letícia** e **Henrique**, por serem sinceros amigos que sempre me acompanham e incentivam. Nossas aparentes diferenças é que tornam nossos laços ainda mais especiais. Vocês são essenciais para que eu possa seguir sempre em frente. Muito obrigada a cada um.*

*Agradeço com muito carinho ao **Lucas Pabis**, meu namorado, melhor amigo e companheiro. Agradeço por todo carinho, compreensão e apoio inefável que você me dedica diariamente. Sou muito feliz por ter você ao meu lado somando as alegrias e dividindo as tristezas de cada dia. Muito obrigada.*

*Agradeço às minhas amigas **Larissa Moreno**, **Natacha Kalline** e **Priscila Garcia** por me ensinarem o valor de uma amizade. Guardo como presente de Deus os laços de amor e amizade que construímos. Obrigada pelo apoio que sempre encontro em vocês.*

*Agradeço às amigas do “BREC”, **Lívia Natale**, **Marina Chiari**, **Tathy Xavier**, **Yvette Alania**. A pós graduação me presenteou vocês como colegas de trabalho. Agradeço pela ótima convivência que tivemos e que se transformou em laços de amizade bem apertados, como a nossa salinha. Obrigada pela grande parceria em exatamente todos os momentos desse curso: de trabalho, de desabafos, de alegrias, de tristezas, de comemorações, de formatações e tudo mais. Muito obrigada.*

Agradeço aos colegas que fiz no decorrer desta pós graduação: Alexander Nishida, Andreas Koren, Ana Carolina Freitas, Bernar Benites, Bruno Lopes, Bruno Reis, Cintia Fukuoka, Érika Cruz, Ezequias Rodrigues, Fabrícia Araújo, Fernando Taddeo, Flávio Umeda, Juliana Castro, Marina Roscoe, Maristela Bonfim, Nívea Salgado, Pedro Albuquerque, Ranulfo Miranda, Thayse Guimarães e Vivian Bradaschia. Em especial aos colegas com quem eu tive maior convivência e que se transformaram em amigos além do convívio diário no departamento: Ana Carolina Romero, André De Vito, Carina Tanaka, Daniele Carvalho, Erick de Lima, Fernando Maeda, Flávia Ibuki, Karen Fukushima, Lucas Hian, Tamara Tedesco, Renata Medeiros, Ricardo Sgura e Susana Salazar. Obrigada a todos.

Agradeço todos os professores do departamento Prof. Dr. Carlos Eduardo Francci, Profa. Dra. Rosa Helena Miranda Grande. Em especial ao Prof. Dr. Igor Studart Medeiros, pela carta de intenção de aceite no momento do meu ingresso no programa de pós graduação. Em especial, ao Prof. Dr. Antônio Muench por toda paciência e dedicação prestada na disciplina de Bioestatística. Em especial aos professores Prof. Dr. Rafael Yague Ballester, Profa. Dra. Josete Barbosa Cruz Meira, Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, Prof. Dr. Leonardo Elloy Rodrigues Filho, Prof. Dr. Paulo Eduardo Capel Cardoso e Prof. Dr. Walter Gomes Miranda Junior com os quais tive a oportunidade de uma maior convivência durante o estágio no curso de graduação, aprendi muito com cada um de vocês, muito obrigada. Em especial, à Profa. Alyne Simões Gonçalves por todo apoio e ajuda com a utilização dos equipamentos de seu laboratório, muito obrigada. Em especial, ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez pela paciência e ajuda que me disponibilizou nas análises de microscopia deste trabalho, muito obrigada. Em

especial ao Prof. Dr. Paulo Francisco César, pelas conversas e momentos compartilhados, além da convivência no departamento, obrigada!

Agradeço a imensa colaboração do Prof. Dr. Giancarlo Espósito de Souza Brito do Instituto de Física da USP e ao pós doutorando Thiago Lewis Reis Hewer do Instituto de Química da USP. A colaboração de vocês foi fundamental para este trabalho. Muito obrigada pela paciência e disponibilidade para me ensinar os diferentes assuntos de química, física e tudo mais que, por vezes, eu nem podia imaginar que existia!

Agradeço a colaboração do Prof. Dr. Sérgio Hiroshi Toma por disponibilizar o uso de equipamentos em seu laboratório no Instituto de Química da USP e me ajudar com as análises de espalhamento de luz dinâmico.

Agradeço às secretárias Rosa Cristina Nogueira e Elidamar Guimarães, pela paciência e disponibilidade que sempre dispuseram para me ajudar no decorrer de todo curso, muito obrigada.

Agradeço ao funcionário Antônio Carlos Lascala, que sempre se disponibilizou a me ajudar com a Instron e com qualquer matriz que eu precisasse. Agradeço imensamente e de forma muito carinhosa ao técnico Douglas Nesadal, acredito que sem sua ajuda eu não teria conseguido fazer muitos passos do meu estudo. Muito obrigada por toda ajuda e por levar nossa amizade para além do convívio dentro do departamento, muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, financiar este meu curso com uma bolsa de estudos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga. Muito obrigada pela confiança que você depositou em mim no início e durante este curso. Agradeço pela boa convivência que tivemos ao longo desses anos. Com certeza, aprendi muito mais do que eu poderia imaginar. Agradeço pelo desenvolvimento na área científica que você me proporcionou, me acompanhando diariamente no progresso de cada trabalho. Agradeço também pelas demonstrações de amizade e preocupação com a minha formação pessoal. Você é um exemplo de dedicação à vida acadêmica, com incansável vontade de estudar, com quem eu aprendi lições para levar para toda vida. Muito obrigada.

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados
pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Rodrigues M. Síntese e caracterização de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas com TEGDMA e sua aplicação no desenvolvimento de materiais resinosos remineralizadores [tese] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2014. Versão Original.

Os objetivos deste trabalho foram : 1) sintetizar e caracterizar partículas de fosfato di-cálcico di-hidratado (DCPD) funcionalizadas com dimetacrilato de trietileno glicol (TEGDMA), com o propósito de reduzir a aglomeração e melhorar a interação entre as partículas e a matriz orgânica dos materiais resinosos e 2) avaliar o efeito da adição de partículas funcionalizadas em uma matriz resinosa em relação a liberação de íons, propriedades ópticas, grau de conversão, propriedades mecânicas e microestrutura do material. Na primeira etapa do trabalho foram sintetizadas pelo método sol-gel dois tipos partículas de DCPD: funcionalizadas e puras. Além dessas, caracterizou-se nesta etapa partículas comerciais do mesmo composto. As partículas foram caracterizadas por difração de raio X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise elementar, análise termogravimétrica (TGA), isothermas de adsorção de nitrogênio e método BET, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz dinâmico (DLS). Na segunda etapa do trabalho, um novo lote de partículas funcionalizadas foi sintetizado, e como controle, sintetizou-se partículas não funcionalizadas. Quatro materiais resinosos foram formulados, um deles contendo apenas BisGMA e TEGDMA (1:1 em mols) e os demais contendo, além da matriz resinosa, 20% (em volume) de partículas funcionalizadas, partículas não funcionalizadas ou sílica coloidal silanizada. Os materiais foram avaliados quanto à liberação de íons, propriedades ópticas (transmitância total e ΔE em relação à resina sem carga), grau de conversão (GC), resistência à flexão biaxial (RFB), módulo de elasticidade e análise microestrutural. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5 %. A composição das partículas foi confirmada por DRX e a funcionalização das mesmas foi confirmada pelas análises de FTIR, análise elementar e TGA. As partículas funcionalizadas apresentaram área superficial até 3 vezes maior quando comparadas às partículas puras e comerciais. Esses dados foram confirmados pela

análise de DLS, que encontrou aglomerados maiores para as partículas dos compostos puro e comercial. Na segunda etapa do estudo, observou-se que a funcionalização das partículas não afetou a liberação de íons Ca^{2+} dos materiais bioativos; entretanto, a liberação de íons HPO_4^{2-} foi 51% menor para o material contendo partículas funcionalizadas. Todos os materiais apresentaram GC semelhantes. O compósito com sílica apresentou valores de transmitância significativamente menores e ΔE superior ao obtido para os demais materiais. A funcionalização das partículas aumentou a RFB em 32%, porém ainda inferior à do compósito com sílica. A funcionalização não afetou o módulo de elasticidade dos materiais. A síntese de partículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA foi realizada com êxito. O monômero funcionalizante contribuiu para a diminuição do tamanho dos aglomerados. Além disso, a funcionalização favoreceu a interação entre as partículas de DCPD e a matriz orgânica dos materiais, evidenciado pelo aumento no valor de resistência à flexão, sem redução substancial na liberação de íons cálcio do material.

Palavras-Chave: Fosfato de Cálcio. Modificação da Superfície. Liberação de íons. Remineralização. Resina Dental.

ABSTRACT

Rodrigues M. Synthesis and characterization of calcium phosphate particles functionalized with TEGDMA and their application in the development of remineralizing resin-based materials [thesis]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2014. Versão Original.

The aims of this study were: 1) to synthesize and characterize dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) particles functionalized with triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), with the purpose of reducing agglomeration and improve the interaction between the particles and the organic matrix of resin-based materials and 2) evaluate the effect of the addition of functionalized particles in a resin matrix regarding ion release, optical properties, degree of conversion, mechanical properties and microstructure. In the first part of the study, two types of DCPD particles were synthesized by a sol-gel method: functionalized and bare. Additionally, proprietary DCPD particles were also characterized. Particles were characterized by X-ray diffraction (DRX), Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR), elemental analysis, thermogravimetric analysis (TGA), Nitrogen adsorption isotherms and BET method, transmission electron microscopy and dynamic light scattering (DLS). In the second part, a new batch was synthesized and, as a control, non-functionalized nanoparticles were synthesized. Four resin-based materials were prepared, one containing only BisGMA and TEGDMA (1:1 in mols) and the other containing besides the resin, 20 % (in volume) of functionalized, non-functionalized or silanized colloidal silica particles. Materials were evaluated for ion release, optical properties (total transmittance and ΔE , in relation to the unfilled resin), degree of conversion (DC), biaxial flexural strength (BFS), elastic modulus and microstructural analysis. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), complemented by Tukey test, with a global significance level of 5%. Particles composition was confirmed by DRX, while functionalization was confirmed by FTIR, elemental analysis and TGA. Functionalized particles presented surface area up to three times higher compared to bare and proprietary particles. These findings were confirmed by DLS, which found larger agglomerates for the bare and proprietary particles. In the second part of the study, it was observed that particle functionalization did not affect Ca^{2+} release from the

bioactive materials; however, HPO_4^{2-} release was 51% lower from the material containing functionalized particles. All materials presented similar DC. The silica composite presented transmittance values significantly lower and higher ΔE than the other materials. Functionalization increased BFS in 32%, however, it remained lower than the silica-containing composite. Functionalization did not affect elastic modulus. The synthesis of functionalized particles was accomplished with success. The functionalized monomer contributed for reducing agglomerate size. Also, functionalization favored the interaction between DCPD particles and the resin matrix of the materials, evidenced by the increase in flexural strength, without substantially reducing calcium release from the material.

Keywords: Calcium Phosphate. Surface Modification. Ion Release. Remineralization. Dental Resin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Concentração de íons (símbolos preenchidos representam íons HPO_4^{2-} e símbolos não preenchidos representam íons Ca^{2+}) após 264 horas de imersão em solução salina tampão de pH 7,4. Valores de liberação de íons de imersão de discos de compósito contendo diferentes percentuais em massa de partículas de fosfato de cálcio amorfo. Círculos: ACP modificado por TEOS; triângulos: ACP P_2O_7 ; quadrados: ACP modificado por ZrOCl_2 ⁴¹30
- Figura 2.2 - Efeito da fração em volume de nanopartículas de DCPA na resina, V_{DCPA} . Liberação de íons HPO_4^{2-} após 56 dias foi relacionado como V_{DCPA} : $\text{HPO}_4^{2-} = 67 V_{\text{DCPA}}$, com coeficiente de correlação com $r=0,99$ ⁵¹31
- Figura 4.1 - Equipamento ICP-OES 700 series (Agilent Technologies) utilizado para realizar as análises de liberação de íons dos materiais em estudo46
- Figura 4.2. - Espectrofotômetro CM-3700d (Konica Minolta) utilizado para as análises de transmitância dos materiais em estudo e delta E47
- Figura 4.3 - Conjunto corpo de prova/lâminas de vidro estabilizado com fitas adesivas colocado em um suporte vertical, de modo perpendicular à passagem do feixe de infra-vermelho para a análise do espectro do material48
- Figura 4.4 – Montagem experimental do ensaio de resistência à flexão biaxial em dispositivo do tipo pistão sobre três bolas com deflectômetro posicionado na parte inferior do corpo de prova50
- Figura 5.1 - Difrátogramas dos compostos em análise. Na parte superior do gráfico o composto comercial, no centro o composto puro e na parte inferior da figura o composto funcionalizado, com os picos de máxima intensidade destacados com asteriscos53
- Figura 5.2 - Espectros obtidos por espectroscopia no infra-vermelho médio com transformada de Fourier, no modo de transmitância das partículas de DCPD e do TEGDMA54
- Figura 5.3 - Gráficos das análises termogravimétricas dos compostos puro (no topo da imagem) e funcionalizado (na parte inferior). Os gráficos mostram os percentuais de perda de massa em função do aumento da temperatura. Os eventos de maior interesse para caracterização dos compostos são destacados no gráfico para efeito de comparação entre os compostos56

Figura 5.4 - Isotermas de adsorção de nitrogênio dos compostos puro (quadrados), comercial (triângulos) e funcionalizado (círculos). No gráfico constam as curvas de sorção e desorção de nitrogênio em função da variação da pressão parcial.....	57
Figura 5.5 - Imagens obtidas em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 250 mil vezes. Nestas imagens, é possível identificar as diferentes morfologias das partículas de cada um dos compostos.....	59
Figura 5.6 - Distribuições de tamanho dos aglomerados de partículas, determinadas por espalhamento de luz dinâmico.....	61
Figura 5.7 - Valores de liberação de íons (em mmol/L) de materiais resinosos contendo 20 vol% de DCPD ao longo de 28 dias. Os quadrados representam o material com partículas não funcionalizadas e os círculos representam o material com partículas funcionalizadas. As cores vermelha e azul representam os materiais que ficaram imersos em solução com pH 5,5 e 7, respectivamente. Marcadores cheios indicam a liberação de cálcio e marcadores vazios indicam a liberação de fosfato. Barras de erro não foram incluídas no gráfico para não haver sobreposição de linhas, o que dificultaria a visualização.....	64
Figura 5.8 - Médias e desvios padrão (representados pelas barras de erro) da transmitância total (em preto) e ΔE (em azul). Letras diferentes da mesma cor indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA/teste de Tukey, $p < 0,05$).....	65
Figura 5.9 - Imagens dos corpos de prova utilizados nas análises de transmitância. Da esquerda para a direita: resina sem carga, resina + DCPD não funcionalizado, resina + DCPD funcionalizado e resina + sílica.....	65
Figura 5.10 - Médias e desvios padrão (representados pelas barras de erro) obtidos para o grau de conversão dos materiais em estudo. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$).....	66
Figura 5.11 - Médias e desvios padrão (representados pelas barras de erro) obtidos para a resistência à flexão biaxial dos materiais em estudo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA/teste de Tukey, $p < 0,05$).....	67
Figura 5.12 - Médias e desvios padrão (representados pelas barras de erro) obtidos para o módulo flexural dos materiais em estudo. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes (ANOVA/teste de Tukey, $p < 0,05$).....	68

Figura 5.13 - Imagens dos materiais resinosos em estudo obtidas em microscopia eletrônica de varredura em *field emission gun* com aumento de 1350 vezes. A: resina + DCPD não Funcionalizado, B: resina + DCPD funcionalizado, C: resina + sílica69

Figura 5.14 - Imagens das partículas primárias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão, com aumento de 100 mil vezes. Estas imagens foram obtidas em cortes ultrafinos do material resinoso contendo 20 vol% de partículas. A: partículas não funcionalizadas, B: partículas funcionalizadas71

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°	Graus
µm	Micrômetros
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
Ca/P	Razão entre o número de átomos de cálcio e átomos de fósforo
Ca ²⁺	Íons cálcio
CaP	Fosfato de cálcio
CDHA	Hidroxiapatita carbonatada
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
DCPA	Fosfato di-cálcico anidro
DCPD	Fosfato di-cálcico di-hidratado
DES/RE	Ciclos de desmineralização e remineralização
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DRX	Difração de raio X
FA	Fluorapatita
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GC	Grau de conversão
GPa	Gigapascal
HA	Hidroxiapatita
HPO ₄ ²⁻	Íons hidrogeno fosfato
m ² /g	Metro quadrado dividido por grama
mA	Miliampère
MCPA	Fosfato monocálcico anidro
MCPM	Fosfato monocálcico monohidratado
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mL/min	Mililitro dividido por minuto
mm	Milímetros
mm ³ /mL	Milímetros cúbicos divididos por mililitro
mmol/L	Milimol dividido por litro
mol/L	Mol dividido por litro

MPa	Megapascal
n	Número de espécimes (tamanho da amostra)
nm	Nanômetros
OA	Oxiapatita
°C/min	Graus célsius dividido por minuto
OCP	Fosfato octacálcico
P	Carga máxima de fratura
$P_2O_7^{4-}$	Pirofosfato
pH	Potencial de hidrogênio
r	Raio
RFB	Resistência à flexão biaxial
RPM	Rotações por minuto
s	Segundos
SAXS	Espalhamento de raio X a baixo ângulo
TEGDMA	Dimetacrilato de trietilenoglicol
TGA	Análise termogravimétrica
TTCP	Fosfato tetracálcico
α -TCP	Alfa Fosfato tricálcico
β -TCP	Beta Fosfato tricálcico
ΔE	Alteração de cor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 GENERALIDADES SOBRE FOSFATOS DE CÁLCIO	24
2.2 O FOSFATO DE CÁLCIO COMO AGENTE TERAPÊUTICO EM ODONTOLOGIA PREVENTIVA E RESTAURADORA	28
2.3 LIBERAÇÃO DE ÍONS EM MATERIAIS RESINOSOS CONTENDO FOSFATO DE CÁLCIO	29
2.4 REMINERALIZAÇÃO <i>IN VITRO/IN SITU</i> DE LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE COM COMPÓSITOS CONTENDO FOSFATO DE CÁLCIO	33
2.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS DE COMPÓSITOS CONTENDO FOSFATO DE CÁLCIO	34
2.6 FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA PARTÍCULA	36
3 PROPOSIÇÃO	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 SÍNTESE DE PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM TEGDMA	39
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	40
4.2.1 Difração de raio X	40
4.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	40
4.2.3 Análise elementar	41
4.2.4 Análise termogravimétrica	41
4.2.5 Isotermas de adsorção de nitrogênio / método BET	42
4.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão	42
4.2.7 Espalhamento de luz dinâmico	43
4.3 EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS SOBRE AS PROPRIEDADES DE UM MATERIAL RESINOSO CONTENDO DCPD	43
4.3.1 Delineamento experimental	43
4.3.2 Manipulação dos materiais resinosos	44
4.3.3 Liberação de íons	44
4.3.4 Propriedades ópticas	46
4.3.5 Grau de conversão	48
4.3.6 Resistência à flexão biaxial e módulo de elasticidade	49

4.3.7 Análise microestrutural	51
4.3.7.1 Análise da superfície de fratura em microscopia eletrônica de varredura	51
4.3.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão	52
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS	53
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	53
5.1.1 Difração de raio X	53
5.1.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	54
5.1.3 Análise elementar	55
5.1.4 Análise termogravimétrica	55
5.1.5 Isotermas de adsorção de nitrogênio / método BET	57
5.1.6 Microscopia eletrônica de transmissão das partículas	58
5.1.7 Espalhamento de luz dinâmico	60
5.2 EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS SOBRE AS PROPRIEDADES DE UM MATERIAL RESINOSO CONTENDO DCPD	62
5.2.1 Liberação de íons	62
5.2.2 Propriedades ópticas	64
5.2.3 Grau de conversão	65
5.2.4 Resistência à flexão biaxial e módulo de elasticidade	66
5.2.5 Análise microestrutural	68
5.2.5.1 Análise da superfície de fratura em microscopia eletrônica de varredura	68
5.2.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão	70
6 DISCUSSÃO	72
6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	72
6.2 EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS SOBRE AS PROPRIEDADES DE UM MATERIAL RESINOSO CONTENDO DCPD	74
6.2.1 Liberação de íons	74
6.2.2 Propriedades ópticas e grau de conversão	77
6.2.3 Propriedades mecânicas e análise microestrutural	78
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE	90

1 INTRODUÇÃO

Ortofosfatos de cálcio (ou simplesmente fosfatos de cálcio) têm sido extensivamente estudados nas últimas décadas devido ao seu potencial papel na mineralização de ossos e dentes ^{1, 2}. Fosfatos de cálcio, naturais ou sintéticos, são altamente biocompatíveis e em contato com os tecidos vivos sofrem dissolução, disponibilizando íons cálcio (Ca^{2+}) e hidrogeno fosfato (HPO_4^{2-}) para o meio ³.

Em biomedicina, fosfatos de cálcio são utilizados em uma variedade de aplicações, por exemplo, em ortopedia ⁴, como veículo para entrega de drogas ⁵, revestimentos para implantes intraósseos ^{6, 7}, na remineralização biomimética com enxertos bioreabsorvíveis ⁸, como marcadores fluorescentes ^{3, 9}, vetores não-virais para terapia genética ^{3, 10} e silenciamento genético ³. Em odontologia, além do recobrimento de implantes osseointegrados, fosfatos de cálcio têm sido incorporados a dentifrícios ¹¹, géis remineralizantes ¹² e clareadores dentais ¹³. Além disso, estes compostos vêm sendo adicionados a matrizes resinosas como possível alternativa para reduzir o risco de desenvolvimento de lesões de cárie secundária resultantes do acúmulo de biofilme em regiões próximas à interface dente-restauração ¹⁴.

In vitro, compósitos experimentais contendo entre 40% e 80% (em peso) de fosfato de cálcio (por exemplo, fosfato de cálcio amorfo, ACP, fosfato di-cálcico anidro, DCPA, ou fosfato tetracálcico, TTCP) foram capazes de recuperar entre 14 e 71% do conteúdo mineral de lesões artificiais de cárie em esmalte ou dentina ¹⁵⁻¹⁸. Quando comparados a materiais comerciais contendo flúor, a remineralização observada com materiais experimentais contendo ACP foi 3,5 vezes maior ^{15, 16}. Recentemente, um estudo *in situ* observou que, na presença de biofilme, restaurações em compósito contendo 40% (em peso) de ACP proporcionaram uma perda mineral significativamente menor no esmalte adjacente à restauração, em comparação a um material contendo somente vidro de bário ¹⁹.

Infelizmente, partículas de fosfatos de cálcio não são eficientes como fase de reforço e sua adição à matrizes resinosas causa uma severa redução na resistência à fratura do material ^{18, 20, 21}. Isso se deve à ausência de uma interação química forte entre as fases orgânica e inorgânica ²², bem como à baixa resistência coesiva dos

aglomerados de fosfatos de cálcio (dados não publicados) ¹. A fim de superar este problema, a funcionalização da superfície de partículas de fosfatos de cálcio com organosilanos foi investigada como forma de aumentar a compatibilidade entre as partículas e a matriz resinosa ²³⁻²⁶. De modo geral, a incorporação de partículas de fosfatos de cálcio silanizadas em matrizes poliméricas mostrou um aumento na resistência à fratura de compósitos em relação aos materiais com partículas não silanizadas ^{23, 25, 26}. Porém, o caráter hidrófobo da molécula de silano retarda o acesso da água à partícula bioativa, reduzindo significativamente liberação de íons ^{25, 27}. Ácidos carboxílicos insaturados (ácidos acrílico e metacrílico), devido à presença dos grupos hidroxila (que apresenta afinidade por íons cálcio) e vinila (capazes de copolimerizar com a matriz resinosa), também foram testados como agentes funcionalizantes de partículas de hidroxiapatita. A adição destas partículas funcionalizadas a resinas de dimetacrilatos resultou em um aumento significativo na resistência à flexão dos materiais em relação ao uso de partículas não funcionalizadas; neste estudo, porém, a liberação de íons não foi avaliada ²⁸.

De modo geral, a funcionalização de partículas de fosfato de cálcio é realizada em uma etapa posterior à sua síntese ^{9, 26, 28-30} e envolve a adsorção das moléculas do agente funcionalizante na sua superfície ³¹. Alternativamente, a funcionalização pode ocorrer no momento da síntese (“funcionalização *ab initio*”). Esta abordagem tem como potencial vantagem a redução na aglomeração das nanopartículas, uma vez que a presença do agente funcionalizante poderia inibir a coalescência das partículas primárias. Entretanto, em um estudo avaliando a aglomeração do ACP funcionalizado *ab initio* com diversos compostos orgânicos foi observado que compostos de alto peso molecular, como o poli(óxido de etileno), levaram à formação de aglomerados maiores. Por outro lado, o uso de surfactantes aniônicos, com peso molecular menor, reduziram em até 45% o tamanho dos aglomerados ³².

Frente ao exposto, o presente estudo propõe um processo de síntese de partículas de fosfato di-cálcico di-hidratado (DCPD) funcionalizadas *ab initio* com dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA). A funcionalização concomitante à precipitação favoreceria uma interação mais forte entre este composto e as partículas, uma vez que nos estágios iniciais de seu crescimento a reatividade destas é maior. Além disso, a incorporação do agente funcionalizante *ab initio* reduziria a coalescência

¹ Dados de trabalho em elaboração. Dados obtidos em trabalho de iniciação científica realizado pela aluna Marina Chiari, sob orientação do Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga (2014).

das partículas primárias, controlando o seu tamanho e aglomeração. O propósito desta invenção é aumentar a interação das partículas com a matriz orgânica de materiais resinosos, uma vez que os grupos metacrilato do TEGDMA poderiam copolimerizar com os monômeros constituintes da fase resinosa. Com isso, bem como pela redução no tamanho dos aglomerados, espera-se que a resistência à fratura de um material resinoso contendo partículas funcionalizadas seja melhorada em relação àquela apresentada por um material contendo partículas de DCPD não funcionalizadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES SOBRE FOSFATOS DE CÁLCIO

Os fosfatos de cálcio (CaP) apresentam grande interesse para a odontologia e para a medicina por serem os principais constituintes de ossos e dentes, além de apresentarem alta biocompatibilidade com os tecidos vivos ¹⁻³. Por estes motivos, os mecanismos físico-químicos envolvidos na cristalização, dissolução e estabilidade de fase destes compostos têm sido extensivamente estudados nas últimas décadas com o objetivo de compreender o processo de mineralização dos tecidos duros ³³.

Por definição, os fosfatos de cálcio são constituídos por três elementos químicos principais: cálcio, fósforo e oxigênio. Além destes, o hidrogênio também pode ser encontrado como constituinte de um ânion ácido (HPO_4^{2-} ou H_2PO_4^-). As diferentes combinações entre estes elementos e a presença ou não de água incorporada à estrutura resultam em uma série de compostos, que podem ser classificados de acordo com o ânion fosfato em orto (PO_4^{3-}), meta (PO_3^-), piro ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) e poli [$(\text{PO}_3)^{n-}$]. Os ânions multivalentes são identificados pelo número de íons hidrogênio ligados ao ânion, como o mono- $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$, di- (CaHPO_4) , tri- $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ e tetra- $(\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7)$ fosfato de cálcio, onde os prefixos “mono”, “di”, “tri” e “tetra” indicam o número de íons hidrogênio que foram substituídos pelo íon cálcio ³⁴. A Tabela 2.1 apresenta as diferentes fases dos ortofosfatos de cálcio e suas principais propriedades.

Tabela 2.1 - Ortofosfatos de cálcio ³⁴

Razão Ca/P	Fase do fosfato de cálcio	Fórmula química	Solubilidade a 25°C (g/L)
0,5	Fosfato monocalcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	~18
0,5	Fosfato monocalcico anidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	~17
1,0	Fosfato dicalcico dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	~0,088
1,0	Fosfato dicalcico anidro (DCPA)	CaHPO_4	~0,048
1,33	Fosfato octacalcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	~0,0081
1,5	α- Fosfato tricalcico (α-TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0025
1,5	β-Fosfato tricalcico (β-TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0005
1,2-2,2	Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ $n = 3-4,5 ; 15-20\% \text{ H}_2\text{O}$	*
1,5-1,67	Hidroxiapatita carbonatada (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	~0,0094
1,67	Hidroxiapatita (HA ou HAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	~0,0003
1,67	Fluorapatita (FA ou FAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$	~0,0002
1,67	Oxiapatita (OA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6$	~0,087
2,0	Fosfato tetracalcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$	~0,0007

As propriedades das diferentes fases dos fosfatos de cálcio podem ser caracterizadas de acordo com a sua proporção entre cálcio e fósforo ². De maneira geral, quanto menor a relação Ca/P, mais ácido e solúvel em água é o composto ³⁵. Compostos com razão molar Ca/P inferior a 1,0 não são úteis na biomedicina por serem muito solúveis ². Por outro lado, a baixa solubilidade das demais fases representa uma dificuldade em algumas aplicações clínicas ³⁶.

Dentre as fases dos ortofosfatos de cálcio, o ACP, DCPD, OCP e β -TCP têm destaque na literatura biomédica e odontológica por serem considerados precursores da apatita em calcificações normais e patológicas. O estudo destes compostos em laboratório envolve a determinação das condições nas quais ocorre sua precipitação e re-precipitação (transformação) como uma nova fase. A síntese de diferentes fases de fosfato de cálcio a partir de soluções supersaturadas é fortemente influenciada pelas condições de pH e temperatura, além da razão molar Ca/P das soluções precursoras. A formação de fases metaestáveis durante a precipitação desses compostos torna o seu estudo bastante complexo ³⁵.

A hidroxiapatita (HA) é uma das cerâmicas de fosfato de cálcio mais utilizada em aplicações biomédicas devido à sua semelhança química com o componente inorgânico dos tecidos duros. A HA pode ser precipitada em pH neutro ou básico e apresenta grande estabilidade em meio aquoso, sendo a fase menos solúvel entre os ortofosfatos de cálcio ^{2, 33}. A estrutura cristalina de HA pode apresentar substituições de íons, que ocorrem normalmente nos locais ocupados por átomos de cálcio. Entre os substituintes mais comuns estão sódio, potássio, magnésio, estrôncio e manganês. Estas substituições afetam os parâmetros da grade cristalina e a morfologia do cristal, além da sua solubilidade e estabilidade térmica. Substituições nas posições dos íons fosfato ou na hidroxila também podem ocorrer. A fluorapatita, por exemplo, é formada pela substituição da hidroxila por íons flúor ².

O fosfato de cálcio na forma amorfa (ACP) vem sendo extensivamente estudado e está presente em muito biomateriais. Dependendo do processo empregado na síntese, o ACP pode apresentar relação Ca/P entre 1 e 2, sendo os valores de 1,5 ou 1,33 os mais comumente encontrados ³⁷. O ACP é relativamente instável no ambiente oral, podendo se transformar em fases cristalinas termodinamicamente mais estáveis e pouco solúveis, como a hidroxiapatita ou a fluorapatita. Esta transformação de fase precoce pode afetar negativamente o seu

potencial remineralizador, uma vez que é necessário que os íons estejam disponíveis para promover a remineralização ³⁶. Para evitar a conversão prematura do ACP em HA, compostos estabilizadores são utilizados durante a síntese. Dentre eles, o pirofosfato tem destaque na literatura ^{32, 38-41}. Outro composto comumente utilizado como agente estabilizador do ACP é o fosfopeptídeo da caseína do leite, formando o complexo conhecido como CCP- ACP ³⁶.

Outras fases de fosfato de cálcio consideradas precursoras na formação da hidroxiapatita e detectadas em cristalizações *in vitro* são o OCP e o DCPD ³³. Estes compostos apresentam um arranjo atômico semelhante ao da hidroxiapatita, o que possibilita o crescimento epitaxial dos cristais de OCP ou DCPD sobre a HA ^{7, 34}. Esses compostos precipitam em soluções ácidas, com pH abaixo de 6,5 ^{33, 42}. OCP é uma fase intermediária e instável que ocorre durante a precipitação de outros fosfatos de cálcio. O DCPD é constituído por cadeias de CaHPO_4 dispostas paralelamente, com duas camadas de água interpostas ⁴³. Este composto é termodinamicamente metaestável em relação à hidroxiapatita ³³ e por isso pode ser considerado como um precursor importante na precipitação de HA ou um composto intermediário no processo de mineralização e desmineralização da apatita ⁴⁴. A transformação de DCPD em apatita é facilitada na presença de flúor e a presença deste íon no momento da transformação de fase resulta na sua incorporação na apatita ³⁵.

O fosfato tricálcico (TCP) apresenta quatro polimorfos, sendo as formas α e β as mais comuns ². A estrutura molecular do β -TCP permite a inclusão de outros íons, como o magnésio, que são capazes de estabilizar a estrutura. A forma pura desse composto não ocorre em calcificações biológicas, apenas na forma estabilizada com manganês, denominada *whitlockite*, que pode ser encontrada em cálculos renais, cartilagens, cálculo dentário e sialólitos ³⁴. *In vitro* o TCP é obtido através de processos químicos envolvendo altas temperaturas, podendo ser formado pela decomposição térmica de hidroxiapatita carbonatada ou pela interação de outras fases no estado sólido com uma base ³⁴.

2.2 O FOSFATO DE CÁLCIO COMO AGENTE TERAPÊUTICO EM ODONTOLOGIA PREVENTIVA E RESTAURADORA

A remineralização pode ser definida como o processo pelo qual íons cálcio e fósforo são fornecidos para a estrutura dentária a partir de uma fonte externa e se depositam em espaços vazios do esmalte desmineralizado, resultando em um ganho de mineral ³⁶. Para que ocorra a remineralização, as diferentes fases de CaP, quando em contato com a saliva, devem se dissolver e liberar os íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} para o meio bucal. Porém, para que ocorra esta dissolução, é necessário que o CaP esteja subsaturado (em relação à concentração salivar) e que o pH bucal esteja abaixo do seu pH crítico ³⁶. As diferentes fases dos CaP apresentam diferentes pHs críticos de solubilidade em saliva. Para o β -TCP, OCP e DCPD, os valores de pH críticos são 6,1; 6,2 e 6,3, respectivamente. O pH 5,5 é adotado como o valor crítico abaixo do qual a hidroxiapatita do esmalte dental começa a se dissolver. Na presença de cristais de fluorapatita, o pH crítico passa a ser 4,7 ⁴⁵.

Com o propósito de promover a remineralização do esmalte dentário, compostos de CaP vêm sendo incorporados a diferentes materiais odontológicos. Como exemplos, o complexo CCP - ACP (Recaldent™) é encontrado em géis mineralizadores (GC Tooth Mousse, GC Corp., Tóquio, Japão) ¹² e em gomas de mascar (Trident White, Cadbury Adams, IL, EUA) ⁴⁶, enquanto que nanopartículas de ACP são encontradas em géis clareadores (Nite White, Discus Dental, CA, EUA) ¹³ e adesivos ortodônticos (Aegis Ortho, Bosworth, IL, EUA) ⁴⁷.

O desempenho desses produtos foi avaliado por estudos *in vitro* que verificaram a eficácia do Recaldent™ na diminuição da hipersensibilidade dentinária em até 92% dos casos, em estudo do tipo *split mouth*, envolvendo com 13 pacientes (74 dentes), durante 21 dias. O efeito foi obtido pela deposição de nanopartículas de ACP na superfície dentinária, proporcionando um reservatório de íons que favorecem a mineralização dentária ⁴⁸. A presença do ACP em géis clareadores para diminuição da sensibilidade pós clareamento dental pode apresentar melhores resultados pela associação com outros agentes como o nitrato de potássio e o flúor ¹³. Um adesivo ortodôntico contendo ACP (Aegis Ortho) mostrou eficácia semelhante a um adesivo

contendo flúor, *in vitro*, na redução da adesão bacteriana e na profundidade de lesões cariosas artificiais ⁴⁹.

2.3 LIBERAÇÃO DE ÍONS EM MATERIAIS RESINOSOS CONTENDO FOSFATO DE CÁLCIO

Os primeiros estudos sobre a incorporação de CaP em materiais resinosos datam de 1981, quando partículas de HA foram incorporadas a uma matriz de Bis-GMA. ⁵⁰. Ao longo de décadas de estudo, alguns fatores foram identificados como determinantes nas concentrações de íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} liberadas estes materiais.

Uma maior liberação de íons foi observada com o aumento da fração em volume de partículas, pois além de aumentar a fonte de íons, também aumenta a área de interfase entre a matriz e a carga, servindo como um caminho mais fácil para difusão de água e íons. Além disso, diminui o grau de conversão do material, o que aumenta a sua permeabilidade e favorece a liberação dos íons ⁵¹. Muitos estudos adotaram como padrão a proporção de 40% em peso ^{16, 18, 32, 52-56} após esta porcentagem ter sido identificada como responsável por uma liberação significativamente maior do que porcentagens menores do que 37,5% (Figura 2.1) ⁴¹.

Figura 2.1 - Concentração de íons (símbolos preenchidos representam íons HPO_4^{2-} e símbolos não preenchidos representam íons Ca^{2+}) após 264 horas de imersão em solução salina tampão de pH 7,4. Valores de liberação de íons de imersão de discos de compósito contendo diferentes percentuais em massa de partículas de fosfato de cálcio amorfo. Círculos: ACP modificado por TEOS; triângulos: ACP P_2O_7 ; quadrados: ACP modificado por ZrOCl_2 ⁴¹

Posteriormente, verificou-se existir uma relação representada por uma função potência, na qual a liberação de fosfato aumenta abruptamente em concentrações volumétricas acima de 15% (Figura 2.2). A liberação de íons Ca^{2+} parece variar menos em função da concentração de partículas de CaP ⁵¹. A menor concentração de íons Ca^{2+} em solução pode ser justificada pela possibilidade de precipitação de partículas de hidroxiapatita sobre o compósito, consumindo mais íons Ca^{2+} que íons HPO_4^{2-} ²⁰.

Figura 2.2 - Efeito da fração em volume de nanopartículas de DCPA na resina, V_{DCPA} . Liberação de íons HPO_4^{2-} após 56 dias foi relacionado como V_{DCPA} : $\text{HPO}_4^{2-} = 67 V_{\text{DCPA}}$, com coeficiente de correlação com $r=0,99$ ⁵¹

O tamanho das partículas é outro fator com grande influência sobre a liberação de íons, tendo em vista que, de modo geral, partículas menores apresentam maior área de superfície. Compósitos contendo 65% em peso de partículas de DCPA com dimensões nanométricas (112 nm) apresentaram concentração de íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} significativamente superiores aos encontrados para os compósitos contendo partículas micrométricas, após 56 dias. Os compósitos contendo partículas micrométricas apresentaram queda de até 70% na liberação de íons HPO_4^{2-} (1 mmol/L para as partículas com 12 μm , 1,8 mmol/L para as partículas com 0,88 μm e 3,5 mmol/L para as partículas com 112 nm). Enquanto que a liberação de íons Ca^{2+} foi semelhante para os dois tamanhos micrométricos (0,88 e 12 μm), e apresentou uma queda de 20% (0,65 mmol/L) em comparação com as partículas nanométricas (0,85 mmol/L). O que justifica estes resultados é a diferença em relação a área de superfície das partículas, que nesse estudo, chega a ser de até duas ordens de grandeza (18,7 m^2/g versus 2,4 e 0,2 m^2/g) ⁵⁷.

O efeito do tamanho das partículas sobre a liberação de íons parece ser mais evidente sobre os íons HPO_4^{2-} . A liberação de íons Ca^{2+} é ligeiramente maior, com o

aumento da área superficial, até a obtenção de um platô em valores próximos à 0,65 mmol/L. Isto ocorre, provavelmente, pela precipitação de partículas de hidroxiapatita no meio. A formação deste precipitado consome dez íons Ca^{2+} e seis íons HPO_4^{2-} . Assim a concentração de íons Ca^{2+} em solução é reduzida ⁵⁸.

Estudos iniciais sobre a liberação de íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} a partir de compósitos bioativos utilizavam soluções salinas tamponadas em pH 7,4 ^{25, 41, 53, 57-59}. Posteriormente, ao se avaliar o efeito do pH das soluções de armazenamento, foi observado que a diminuição do pH da solução aumentou a liberação de íons em materiais contendo partículas de TTCP. A liberação de íons Ca^{2+} chega a ser 20 vezes maior em pH 4,0, comparado ao pH 7,4. De modo semelhante, a liberação de íons HPO_4^{2-} que pode ser até 50 vezes maior no pH mais ácido. A característica de modificar o seu comportamento em função das condições de pH faz com que os compósitos bioativos possam ser considerados “materiais inteligentes” ^{20, 21}.

Outro possível efeito benéfico da liberação de íons, porém ainda controverso na literatura, é a neutralização do pH do meio, com efeito sobre a atividade microbiana. A liberação de íons hidrogeno fosfato (HPO_4^{2-}) pode neutralizar pHs ácidos. No decorrer de 10 minutos, um compósito contendo ACP (40% em massa) foi capaz de elevar o pH de 4 para 5,7. A rápida recuperação do pH local pode ajudar na sobrevivência de bactérias menos acidófilas, o que pode exercer um efeito protetor sobre o dente ao inibir a proliferação de bactérias cariogênicas. Além disto, o crescimento bacteriano sobre os compósitos contendo ACP foi significativamente menor quando comparado ao compósito comercial ⁵².

Resultados divergentes foram encontrados em biofilmes cultivados sobre compósitos contendo nanopartículas de ACP. Foi possível quantificar íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} no biofilme sobre os compósitos bioativos, porém não foi observada diferença significativa entre esses compósitos e um controle comercial no número de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus* totais, *Streptococcus Mutans* e *Lactobacillus*

2.4 REMINERALIZAÇÃO *IN VITRO* / *IN SITU* DE LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE COM COMPÓSITOS CONTENDO FOSFATO DE CÁLCIO

Apesar das limitações evidentes, estudos *in vitro* / *in situ* podem servir como prova de conceito para comprovar a possibilidade de remineralização de lesões com compósitos bioativos ¹⁵. Um compósito contendo 40% em peso de ACP quando em contato com lesões artificiais em esmalte bovino, promoveu um ganho mineral de até 71% em um modelo de remineralização estático, após 28 dias. No modelo dinâmico, com ciclos DES/RE durante 14 dias, o mesmo material foi capaz de promover um ganho mineral de até 38% na lesão. Os grupos controles no modelo dinâmico, contendo partículas de sílica ou de hidroxiapatita, apresentaram perda mineral de 9 e 6%, respectivamente ¹⁸. Outro estudo *in vitro* demonstrou que compósitos resinosos contendo aproximadamente 20% em peso de partículas de DCPA e 60% de partículas de TTCP promoveram um ganho mineral na dentina entre 38% e 47% após 5 semanas ¹⁷.

Compósitos com partículas de CaP resultaram em um ganho mineral superior àquele conseguido com materiais comerciais contendo flúor. Um compósito contendo partículas de ACP proporcionou um ganho mineral de 14% de lesões em esmalte, significativamente maior do que um cimento adesivo ortodôntico contendo flúor (4%) após 30 dias de ciclagem DES/RE ¹⁵. Resultados semelhantes foram obtidos com um compósito resinoso contendo 40% em peso de nanopartículas de ACP, que demonstrou capacidade de remineralizar lesões subsuperficiais com um ganho mineral de 22%, valor significativamente maior que o encontrado para o material comercial contendo flúor (6%) ¹⁶.

Materiais liberadores de flúor se mostraram mais eficientes na regeneração dos minerais perdidos nas camadas mais superficiais da lesão cariiosa (até 50 μ m), enquanto que os materiais contendo CaP são mais eficazes na remineralização das porções mais profundas da lesão. Este depósito superficial de mineral na porção mais superficial da lesão pode dificultar a remineralização de áreas mais profundas ao ocluir os poros superficiais da lesão. A incapacidade do flúor em penetrar profundamente no esmalte o coloca em desvantagem em relação ao ACP, especialmente considerando-

se que a saliva por si só tem capacidade remineralizante em profundidades de até 100 μm ¹⁵.

Recentemente, um estudo *in situ* verificou que um compósito contendo 40% em massa de nanopartículas de ACP foi capaz de reduzir a perda mineral na interface esmalte / restauração para 10 μm , o que corresponde à $1/3$ da perda mineral observada para um compósito contendo apenas vidros de bário (33 μm). A liberação acumulada de íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} em pH 5,5 ao fim do estudo foi de 4 mmol/L e 1 mmol/L, respectivamente. É importante destacar que estudos *in situ* são capazes de reproduzir toda complexidade da cavidade bucal como o fluxo salivar, ecossistema de bactérias e desafios cariogênicos, e dentro desse complexo sistema o compósito bioativo foi capaz de promover uma remineralização de 59% da estrutura dentária ¹⁹.

2.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS DE COMPÓSITOS CONTENDO FOSFATO DE CÁLCIO

A adição de partículas de fosfato de cálcio promove uma redução na resistência à fratura dos materiais restauradores. Por exemplo, a resistência à flexão biaxial (RFB) de compósitos contendo 40% em massa de partículas de ACP apresentou valores de RFB (54 MPa) correspondendo a menos da metade dos valores encontrados para resinas sem carga (127MPa) ⁴¹. Isto ocorre porque não há interação entre as fases orgânica e inorgânica do compósito. A ausência de interação entre as partículas de CaP e a matriz resinosa leva a uma concentração de tensões na interface matriz/partícula favorecendo a propagação de trincas que levam à fratura do material ²².

A baixa resistência mecânica destes materiais relatada em diversos estudos fez com que estes materiais fossem indicados para forramento, ³⁹, colagem de braquetes ortodônticos ^{15, 39, 55, 60}, selantes de superfície ^{47, 55} e materiais para selamento endodôntico ⁵⁵, ou seja, aplicações clínicas onde a solicitação mecânica é relativamente baixa.

Na tentativa de melhorar as propriedades mecânicas dos compósitos bioativos, foi proposta a incorporação de partículas de reforço. O primeiro trabalho utilizou

whiskers de carbetto de silício com sílica incorporada, os quais quando adicionados em uma proporção de 40% em massa juntamente com 20 % de partículas de DCPA resultaram em aumento na RFB de cerca de 18 % em relação ao material contendo os percentuais inversos de DCPA (40%) e *whiskers* (20%). A adição dos *whiskers* não afetou a liberação de íons; porém, resultou em um material opaco, cuja ativação não poderia ser feita através da luz ⁵⁹. Outras partículas de reforço também foram avaliadas, como os *whiskers* de nitreto de silício. Um material contendo 75% em massa de partículas inorgânicas (1:1 de DCPA e *whiskers*) apresentou RFB (117 MPa) estatisticamente semelhante ao de um compósito híbrido comercial contendo 78% de partículas de vidro silanizadas (112 MPa). Com relação ao módulo de elasticidade, o compósito experimental apresentou valor superior ao encontrado para o compósito comercial controle (15 e 12 GPa, respectivamente) ⁶¹.

É importante ressaltar que este aumento dos valores de RFB não se deve somente a incorporação dos *whiskers*, mas também à utilização de partículas de CaP com tamanho nanométrico ^{59, 61}. As partículas menores podem apresentar uma distribuição mais homogênea, reduzindo as dimensões dos defeitos na rede polimérica que podem funcionar como sítios iniciadores de trincas ^{32, 40}. Porém, quando se compara a influência do tamanho das partículas de CaP com a presença de partículas de reforço, observa-se que as propriedades mecânicas são mais intensamente influenciados pela presença de partículas de reforço do que pelo tamanho das partículas de CaP ²¹.

Partículas de vidro de borosilicato de bário e alumínio, comumente encontradas em compósitos híbridos comerciais, também foram avaliadas como recurso para melhorar as propriedades mecânicas de compósitos bioativos ⁶²⁻⁶⁴. Partículas de vidro com tamanho médio de 1,4 μm foram adicionadas a uma matriz resinosa contendo partículas de TTCP (40% em massa). A incorporação de 30% em massa de partículas de vidro resultou em uma melhora estatisticamente significativa dos valores de resistência a flexão (99 MPa) e módulo de elasticidade (11 GPa) quando comparada a resinas bioativas sem nenhum tipo de partículas de reforço (54 MPa e 2 GPa, respectivamente) ²¹.

2.6 FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA PARTÍCULA

Outra abordagem para tentar aumentar a resistência à fratura de compósitos contendo fosfatos de cálcio é a modificação da superfície das partículas no sentido de melhorar sua dispersão na matriz orgânica e promover uma melhor interação entre as fases do compósito. A modificação da superfície das partículas pode ocorrer pela incorporação de compostos surfactantes na síntese das partículas ou através da adsorção de agentes de ligação à superfície das partículas ³¹.

A modificação da superfície de partículas de ACP com agentes de acoplamento como o poli(óxido de etileno), compostos não iônicos (Triton 100, Tween 80 Zonyl e FSN), e surfactantes aniônicos (Zonyl e FSP) demonstrou que apenas os representantes do último grupo foram capazes de diminuir o diâmetro médio das partículas de ACP, em 45%. Já a incorporação do poli(óxido etileno) proporcionou uma maior agregação das partículas, justificada pela formação ligações entre as partículas através de “pontes de polímero” ³². Porém, independente da possível aglomeração, os compósitos contendo partículas de HA modificadas com o poli(óxido etileno) apresentaram propriedades mecânicas melhoradas ²⁹.

A silanização das partículas de CaP foi proposta com o objetivo de criar uma interação química entre as fases do compósito resinoso ^{23, 25, 28, 29, 32, 65}. O agente de ligação silano é uma molécula bifuncional capaz de reagir com os grupos silanol, formando ligações Si-O-Si com a superfície do material bioativo, e com a fase orgânica da resina composto por meio de copolimerização ²⁷. O agente de silanização mais comumente utilizado para esta finalidade é o metacriloxipropiltrimetoxissilano (MPTMS) ^{23, 25, 26}, um organossilano que apresenta um grupo vinila polimerizável. Este composto se une à partícula de CaP por meio de ligações de hidrogênio entre os grupos silanol e o grupo fosfato ²⁷.

O tratamento de superfície de partículas de HA com silano aumentou em até 52% a resistência à flexão dos materiais contendo 60 ou 67% em massa de partículas HA. Além dos resultados observados para a RFB, a dureza e a resistência à tração diametral dos materiais também aumentou. O fenômeno observado foi atribuído a dois diferentes mecanismos: (a) melhor dispersão das partículas na matriz e (b) a possível

existência de ligações químicas entre as duas fases, devido à união entre as hidroxilas da HA e o agente silano ²³.

Porém, observou-se que a silanização das partículas de CaP reduz a liberação de íons, principalmente para os íons Ca^{2+} , que apresentou queda de até 50% em compósitos contendo somente DCPA ²⁵. Resultados semelhantes foram encontrados quando o agente silano foi incorporado a nanopartículas de DCPA com a superfície recoberta por nanocristais de DCPD. Ambos os tratamentos de superfície reduziram a liberação de íons Ca^{2+} e HPO_4^{2-} ²⁷. O silano apresenta característica hidrofóbica e, assim, retarda o acesso da água às partículas, dificultando sua dissolução e consequente liberação de íons ^{25, 27}.

Monômeros mais hidrofílicos como o ácido acrílico e metacrílico foram avaliados como agentes de acoplamento a partículas de HA. Os resultados obtidos demonstram um aumento de até 75% nos valores de RFB dos compósitos, em relação a materiais contendo HA não funcionalizada, provavelmente porque estes compósitos aumentaram a interação da partícula com a rede polimérica. Porém, a liberação de íons desses compósitos não foi avaliada e o grau de conversão dos compósitos foi comprometido devido a diferenças no índice de refração das fases do material ²⁸. Em compósitos convencionais, o índice de refração em relação as duas fases do material (orgânica e inorgânica) se aproxima de 1. As partículas de HA apresentam índice de refração superior (entre 1,63 e 1,67) ao das partículas de vidro (1,55), que por sua vez, apresenta valor próximo ao da matriz orgânica (entre 1,50 e 1,55) ²³. Assim, a presença de partículas de HA pode comprometer tanto a estética dos materiais, como afetar a passagem de luz durante o processo de polimerização dos materiais, prejudicando seu grau de conversão ²⁸.

A literatura evidencia que a incorporação de partículas de fosfato de cálcio em materiais resinosos demonstra ser uma alternativa promissora para controlar o desenvolvimento de lesões cariosas secundárias, através da remineralização. Porém, o prejuízo às propriedades mecânicas do material restaurador ainda representa um desafio a ser superado. Assim, é necessário que novas abordagens sejam propostas para que materiais bioativos sejam desenvolvidos com uma combinação de propriedades mecânicas e remineralizadoras adequadas para uso em odontologia restauradora.

3 PROPOSIÇÃO

Como base no exposto, o presente estudo teve como objetivos:

- Sintetizar e caracterizar partículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA, com a finalidade de reduzir a aglomeração e melhorar a interação entre a partícula e a matriz orgânica de materiais resinosos experimentais.
- Avaliar o efeito da adição de partículas funcionalizadas em uma matriz resinosa com relação à liberação de íons, propriedades ópticas, grau de conversão, propriedades mecânicas e microestrutura do material. Como controle, foram utilizadas partículas de DCPD não funcionalizadas. Também para fins de comparação, foram testadas a resina sem carga e um compósito contendo sílica coloidal silanizada. A hipótese nula é que a funcionalização das partículas não influencia as variáveis estudadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DE PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS COM TEGDMA

Para a primeira etapa deste estudo foram sintetizados dois tipos de partículas de fosfato di-cálcico di-hidratado (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): partículas funcionalizadas com dimetacrilato de trietileno glicol (TEGDMA ou ácido 2-metil-2-propenóico) e partículas puras. Como controle da síntese laboratorial, foi utilizado um pó de DCPD comercial (Labsynth, Diadema, SP, Brazil).

As partículas foram sintetizadas através de um processo sol-gel em meio aquoso envolvendo a reação estequiométrica entre o fosfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Reagen, Quimibrás Indústria Química Ltda. Rio de Janeiro, RJ), e o nitrato de cálcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (CAAL – Casa Americana, de Artigos para Laboratório Ltda., São Paulo, SP). Soluções dos dois reagentes com concentrações iguais (0,078 mol/L) foram preparadas em temperatura ambiente e sob agitação magnética. As massas dos reagentes foram definidas de modo que a síntese resultasse em aproximadamente 10 g de material. Para a síntese das partículas funcionalizadas, foi adicionado à solução de fosfato de amônio 6,86 g de TEGDMA (ESSTECH, Technology Inc., Essington, PA), mantendo-se a proporção de 2,5 mol de DCPD para cada mol de monômero.

A solução de nitrato de cálcio foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica (9 mL/min) sobre a solução de fosfato de amônio. Terminado o gotejamento, a solução final foi mantida sob agitação por 30 minutos. Após aguardar-se a decantação das partículas por 15 minutos, o sobrenadante foi removido e iniciou-se uma série de cinco ciclos de lavagem do precipitado para a remoção do subproduto da reação (nitrato de amônio) e do excesso de TEGDMA. A lavagem consistiu na adição água destilada ao precipitado, e agitação da mistura, em tubos, em um agitador do tipo Vertex por 3 minutos (Phoenix Indústria e comércio de equipamentos científicos, modelo AT56, Araraquara, SP) e ultracentrifugação (3000 RPM) a -4°C (Thermo Fisher Scientific, modelo Sorvall RC 6 Plus, Asheville, NC, EUA) por três minutos para separação das fases do material. Em seguida, o sobrenadante era

desprezado e iniciava-se um novo ciclo de lavagem. Ao final do quinto ciclo, o precipitado foi congelado em gelo seco e liofilizado (Virtis an SP Industries Company, modelo Benchtop, Gardiner, NY, EUA) até a obtenção de um pó branco.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

As partículas foram caracterizadas utilizando-se difração de raio X, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, análise elementar, análise termogravimétrica, isortermas de adsorção de nitrogênio e método BET, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz dinâmico.

4.2.1 Difração de raio X

Difratogramas foram obtidos em um difratômetro Rigaku-Multiflex do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, empregando o método do pó. Os dados foram coletados no modo “passo a passo”, com passo de $0,05^\circ$, tempo de contagem de 10 s por ponto, variando de 10° a 60° com 15 RPM. Foi utilizada radiação de $\text{CuK}\alpha$ filtrada por níquel com 40 kV e 30 mA. A geometria utilizada nesse equipamento é $\theta/2\theta$, onde a amostra é fixa, enquanto o feixe emissor se move em θ e o detector em 2θ .

4.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As partículas foram analisadas através de espectroscopia no infravermelho médio. Utilizou-se o espectrômetro com detector DLaTGS (Vertex 70, Bruker Optik GmbH, Alemanha) com o auxílio de uma unidade de *attenuated total reflectance* (ATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) (Pike Technologies, Inc., Madison, WI, EUA).

Os espectros foram obtidos no modo de transmitância entre comprimentos de onda de 3600 cm^{-1} e 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.3 Análise elementar

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio das partículas foram determinados no laboratório da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando-se o analisador de CHN (Perkin-Elmer, modelo 240). Nesta técnica, aproximadamente 1 mg de amostra é aquecido até $925\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de oxigênio puro. Os gases resultantes (CO_2 , H_2O e N_2) são arrastados por gás hélio puro, homogeneizados, separados através de colunas específicas e seus percentuais são determinados por um detector de condutividade térmica. A resolução do equipamento é de 0,3%.

4.2.4 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada no laboratório da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Utilizou-se analisador termogravimétrico (TGA 2950, TA Instruments, New Castle, DE, EUA) com atmosfera de nitrogênio e temperaturas entre 25 e $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Durante a análise, a variação de massa da amostra resultante da eliminação de seus componentes é registrada em função da temperatura. Além das partículas de DCPD, uma amostra do monômero funcionalizante TEGDMA também foi submetida à análise.

4.2.5 Isotermas de adsorção de nitrogênio / método BET

As isotermas de adsorção de nitrogênio dos materiais foram obtidas no Laboratório do Grupo de Pesquisa de Química Ambiental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As amostras foram avaliadas em um equipamento Quantachrome (modelo NOVA 100E, Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, EUA) na temperatura do nitrogênio líquido (-196° C). Previamente à análise, as partículas funcionalizadas com TEGDMA foram submetidas a três ciclos de lavagem com acetona para completa remoção do monômero, uma vez que sua presença poderia dificultar a interação do nitrogênio com a superfície das partículas e comprometer a precisão do teste.

A área superficial específica dos materiais foi determinada com o auxílio do *software* NOVWin (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, EUA) a partir das isotermas de adsorção e método BET (Brunauer, Emmett e Teller) ⁶⁶, empregando a equação (1) descrita abaixo, onde W é a massa adsorvida (g), P/P_0 é a pressão relativa do adsorbato, W_m é a massa da monocamada adsorvida (g) e C é a constante de BET.

$$\frac{1}{W\left[\left(\frac{P}{P_0}\right)-1\right]} = \frac{1}{W_m C} + \frac{C-1}{W_m C} \left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (1)$$

4.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia das partículas foi caracterizada através de microscopia eletrônica de transmissão (JEM modelo 1010, Tóquio, Japão), com aceleração de 80 kV e aumento de 250 mil vezes. Previamente às análises, as partículas foram dispersas em álcool isopropílico e após 24 horas algumas gotas do sobrenadante foram depositadas sobre telas de níquel de 200 meshes recobertas com uma película de poli(vinil formol) (Formvar). Com auxílio do *software* Image J (National Institute of

Health, Bethesda, MD, EUA), mediu-se as dimensões de 30 partículas de cada grupo experimental.

4.2.7 Espalhamento de luz dinâmico

A distribuição de tamanho dos aglomerados de partículas foi estimada no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo utilizando o equipamento Nanotracs 252 (Microtracs, Montgomeryville, PA, EUA). Suspensões das partículas em isopropanol foram levadas ao ultrassom (Embrasol TEC, Limp Sonic, modelo LS-08D, São Paulo, SP) por 10 minutos. Vinte minutos depois, o sobrenadante foi coletado para análise, que consistiu em três varreduras de 60 segundos cada.

4.3 EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS SOBRE AS PROPRIEDADES DE UM MATERIAL RESINOSO CONTENDO DCPD

4.3.1 Delineamento experimental

Para esta etapa do estudo, foram sintetizados dois novos lotes de partículas, sendo um lote constituído por partículas funcionalizadas com TEGDMA e outro por partículas em cuja síntese foi adicionado o carboximetilcelulose (CMC) ao invés do TEGDMA. O CMC foi utilizado como um agente surfactante com o único objetivo de controlar o crescimento das partículas de DCPD. Por ser hidrossolúvel, o CMC foi totalmente removido durante os ciclos de lavagem. As partículas foram caracterizadas através da análise elementar, isotermas de adsorção de nitrogênio e espalhamento de luz dinâmico, seguindo os métodos descritos no item 4.2.

Foram definidos quatro grupos experimentais. Além do material resinoso contendo partículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA e do material controle

contendo partículas de DCPD não funcionalizadas, foram testados como controles adicionais a matriz resinosa sem carga (“resina sem carga”) e um compósito contendo sílica coloidal silanizada (Aerosil, OX-50, Evonik, Addison, IL, USA, “sílica”). Nos três materiais particulados, a fração volumétrica de partículas foi definida em 20%.

4.3.2 Manipulação dos materiais resinosos

Foi preparada uma matriz orgânica à base de BisGMA (2,2-bis[4-(2-hidroxi-3-metacriloxipropoxi)fenil]-propano, ESSTECH Technology Inc., Essington, PA) e TEGDMA (2-metil 2-ácido propenóico, ESSTECH) na proporção de 1:1 em mols. Os fotoiniciadores DMAEMA, (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) e canforoquinona (Sigma- Aldrich Inc., Steinhein, Alemanha) foram adicionados em 0,5% em peso. Para o cálculo da massa de partículas correspondente a 20% em volume que seria adicionada à resina, a densidade teórica das partículas foi determinada em um picnômetro à hélio (Ultrapyc 1200e, Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, EUA).

Os cálculos realizados para a formulação dos materiais resinosos estão detalhados no Apêndice A. Os compostos foram pesados com auxílio de uma balança analítica com precisão de 0,1 mg (Mettler Toledo XS105 Dual Range, Columbus, OH, EUA) e misturados mecanicamente sob vácuo, por 2 minutos a 2500 RPM (Speed Mixer DAC 150.1 FVZ-K, Flack Tek, Inc. Landrum, SC, EUA). Os materiais resinosos foram armazenados em recipientes protegidos da luz e sob refrigeração até 1 hora antes do uso.

4.3.3 Liberação de íons

Para avaliação da liberação de íons cálcio e fosfato dos materiais contendo DCPD, foram confeccionados corpos de prova (n=3) com auxílio de uma matriz de silicone, a qual foi prensada entre duas lâminas de vidro até atingir a espessura de

0,8 mm. Após a polimerização do silicone, foi feita uma perfuração no centro da matriz com diâmetro de 4,3 mm no qual o material resinoso foi inserido e prensado entre as lâminas de vidro. A fotoativação foi realizada empregando-se um aparelho com LED (Radii-Cal, SDI, Bayswater, Australia), com densidade de energia de 48 J/cm² (1200 mW/cm² x 40 s). Após 24 h em estufa a 37°C, sob umidade relativa de 100%, o diâmetro e a altura do corpo de prova foram determinados com auxílio de um paquímetro digital e o seu volume foi calculado de acordo com a equação (2):

$$v = \pi . r^2 . h \quad (2)$$

Foram preparadas soluções de cloreto de sódio (133 mmol/L), tamponadas em dois diferentes pHs: pH = 5,5, através da adição de ácido acético (50 mmol/L) e pH = 7, com a adição de HEPES (50 mmol/L) ²¹. Cada corpo de prova foi armazenado em um tubo tipo Falcon com aproximadamente 5 mL de uma das soluções tamponadas, de modo que a relação entre o volume do corpo de prova e o volume da solução foi padronizado em 3 mm³/mL ⁴¹. Os corpos de prova ficaram imersos por um período total de 28 dias, sendo que a cada sete dias a solução era coletada para a avaliação da liberação de íons e substituída por uma solução nova. Previamente à análise de íons, as amostras foram acidificadas com ácido nítrico (HNO₃) a 10% na proporção de 1:1 e filtradas em papel filtro com porosidade de 3 µm.

A liberação de íons cálcio e fósforo foi determinada por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES 700 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA, Figura 4.1). Resumidamente, esta técnica utiliza radiofrequência para produzir um campo magnético responsável pela ionização do gás argônio, criando um plasma de alta temperatura. Os átomos ou íons da amostra colidem com os elétrons e íons no plasma, atingindo um estado excitado. Ao voltar para um estado não excitado, são emitidos fótons com comprimentos de onda característicos para cada elemento químico, e a sua intensidade está relacionada com a concentração do elemento na amostra. Os fótons são captados por um fotodetector e convertidos em um sinal elétrico, cujo valor é correlacionado a concentrações de

cálcio e fósforo determinadas em curvas de calibração, utilizando os comprimentos de onda de 422,673 para cálcio e 177,434 para o fósforo.

Figura 4.1 - Equipamento ICP-OES 700 series (Agilent Technologies) utilizado para realizar as análises de liberação de íons dos materiais em estudo

4.3.4 Propriedades ópticas

A transmitância total e diferença de cor em relação à resina sem carga dos materiais foram avaliadas através de espectrofotometria (CM-3700d, Konica Minolta, Ramsey, NJ, EUA, Figura 4.2). Foram confeccionados corpos de prova em forma de disco (4,3 x 0,8 mm, n=10) de modo semelhante ao descrito para o teste de liberação de íons. Os corpos de prova foram armazenados em estufa a 37°C por 24 horas, previamente à análise.

Para a análise, o corpo de prova foi posicionado perpendicularmente a um feixe de luz emitindo radiação na faixa de comprimento de onda da luz visível (360 a 740 nm) gerado por uma lâmpada de arco de xenônio. As parcelas de luz transmitida e refletida eram direcionadas por um sistema de lentes até sensores específicos. O *software* OnColor™ QC Lite (T & M Instruments, São Paulo, SP) disponibiliza os

valores de transmitância para cada comprimento de onda e a transmitância total foi calculada como sendo a média dos valores de transmitância obtidos em cada comprimento de onda.

Além da transmitância, a diferença de cor dos materiais em relação à resina sem carga (ΔE) foi calculada com base nos valores do sistema de cores CIEL*a*b*. As coordenadas dos parâmetros L*, a* e b* foram utilizadas na equação (3) descrita abaixo para mensurar a alteração de cor ⁶⁷.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

Figura 4.2. - Espectrofotômetro CM-3700d (Konica Minolta) utilizado para as análises de transmitância dos materiais em estudo e delta E

4.3.5 Grau de conversão

O grau de conversão dos materiais resinosos foi determinado por espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier. Foram confeccionados corpos de prova ($n=3$) utilizando-se uma matriz de silicone com espessura de 0,9 mm e orifício central com diâmetro de 7,0 mm. O material resinoso foi inserido na matriz, prensado entre duas lâminas de microscópio e o conjunto foi estabilizado com fitas adesivas. Este conjunto foi posicionado perpendicularmente ao feixe de infra-vermelho, de forma que este passasse pelo centro do corpo de prova (Figura 4.3). O espectro do material não-polimerizado foi obtido no intervalo de comprimentos de onda entre 4000 cm^{-1} a 9840 cm^{-1} , com resolução de 6 cm^{-1} (Vertex 70, Bruker Optik GmbH, Alemanha).

Figura 4.3 - Conjunto corpo de prova/lâminas de vidro estabilizado com fitas adesivas colocado em um suporte vertical, de modo perpendicular à passagem do feixe de infra-vermelho para a análise do espectro do material

Em seguida, o material foi fotoativado através da lâmina de vidro seguindo os mesmo parâmetros já descritos, e o corpo de prova foi armazenado a 37° C por 24 h. Transcorrido este período, um novo espectro foi coletado. Com auxílio do *software*

Opus v.6 (Bruker Optics), a área sob a banda de absorção da ligação vinílica localizada a 6165 cm^{-1} foi calculada. O grau de conversão (GC) dos materiais foi obtido dividindo-se a área determinada para um dado espectro (material polimerizado) pela área mensurada do primeiro espectro (ou seja, do material não-polimerizado), segundo a equação (4):

$$GC = \left(1 - \frac{\text{polimerizado}}{\text{não polimerizado}} \right) .100 \quad (4)$$

4.3.6 Resistência à flexão biaxial e módulo de elasticidade

Para realização do ensaio de flexão biaxial, foram confeccionados corpos de prova em forma de disco ($12 \times 1,2\text{ mm}$) em uma matriz de aço bipartida. Após a inserção do material resinoso, uma tira de poliéster foi posicionada sobre o material, seguida pela colocação de uma lâmina de microscópio. A fotoativação foi feita por 10 segundos em cada quadrante do corpo de prova utilizando-se o mesmo equipamento fotoativador empregado nos testes anteriores. Em seguida, o corpo de prova foi removido da matriz e uma lixa de granulação 600 foi utilizada para o acabamento das bordas dos discos. Em seguida, suas dimensões foram aferidas com um paquímetro digital. Os corpos de prova foram armazenados em água destilada a 37° C por 24 horas.

Para o teste de flexão biaxial, foi utilizado um dispositivo do tipo “pistão sobre três bolas”, cuja base apresenta esferas de aço de $2,5\text{ mm}$ de diâmetro dispostas em um círculo com 10 mm de diâmetro a 120° uma da outra. A carga é aplicada no centro do disco por um pistão de ponta plana e $1,2\text{ mm}$ de diâmetro. Este dispositivo foi posicionado em uma máquina de ensaios universal (modelo 5565, Instron Corp, Canton MA, EUA). No momento do teste, os corpos de prova eram centralizados sobre as esferas com a face irradiada correspondendo à superfície na qual a carga foi aplicada. Um deflectômetro (modelo W-E401-E, Instron Corp., Norwood, MA, EUA) foi

posicionado sob o centro do disco para monitorar o deslocamento naquela região (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Montagem experimental do ensaio de resistência à flexão biaxial em dispositivo do tipo pistão sobre três bolas com deflectômetro posicionado na parte inferior do corpo de prova

O ensaio foi realizado com taxa de carregamento de 0,5 mm/min. A resistência à flexão biaxial (σ_{BI}), em MPa, foi calculada utilizando as seguintes equações (5, 6 e 7):

$$\sigma_{BI} = \frac{-0,2387P(X-Y)}{b^2} \quad (5)$$

$$X = (1 + \nu) \ln \left(\frac{r_2}{r_3} \right)^2 + \left[\left(\frac{1-\nu}{2} \right) \right] \left(\frac{r_2}{r_3} \right)^2 \quad (6)$$

$$Y = (1 + \nu) \left[1 + \ln \left(\frac{r_1}{r_3} \right)^2 \right] + (1 - \nu) \left(\frac{r_1}{r_3} \right)^2 \quad (7)$$

Onde P é a carga máxima de fratura (em N); b é a espessura do disco (em mm); ν é o coeficiente de Poisson; r_1 é o raio do círculo em que estão posicionadas as esferas de aço (5,0 mm); r_2 é o raio da ponta do pistão ou da área de aplicação da carga (0,6 mm); r_3 é o raio do disco (em mm). O coeficiente de Poisson adotado foi de 0,30 para todos os materiais ⁶⁸.

Os valores de módulo de elasticidade foram calculados utilizando a seguinte equação (8) ⁶⁹:

$$E = \frac{\beta P a^2}{\omega h^3} \quad (8)$$

Onde E é o módulo de elasticidade (em MPa), β é uma constante relacionada à deflexão do disco na região central (0.509), P é a carga aplicada (em N), a é o raio do disco (em mm), ω é a deflexão no centro e h é a espessura do disco (em mm).

4.3.7 Análise microestrutural

4.3.7.1 Análise da superfície de fratura em microscopia eletrônica de varredura

Após o ensaio mecânico, fragmentos dos corpos de prova foram recuperados e as superfícies de fratura foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Previamente as análises, os corpos de prova foram levados ao ultrassom por 10 minutos para limpeza. Em seguida, os fragmentos foram fixados em *stubs* com auxílio de uma fita de carbono e recobertos com carbono. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura *field emission gun* (FEG, Quanta 600, FEI Corp., OR, EUA) no modo de elétrons retroespalhados.

4.3.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão

O aspecto das partículas de DCPD na matriz orgânica também foi observado em microscópio eletrônico de transmissão (MET). Foram preparados corpos de prova retangulares (10 x 1 x 1 mm) com auxílio de uma matriz metálica bipartida. Após 24h a 37°C, estes blocos foram embutidos em resina epóxica e, após 48h a 70°C, os blocos em resina epóxica foram seccionados em um ultra micrótomo para a obtenção de fatias com cerca de 70 nm de espessura. As fatias foram depositadas sobre telas de níquel de 200 meshes e observadas no mesmo equipamento descrito no item 4.2.6, com aumento de 100 mil vezes.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de liberação de íons, transmitância total, ΔE , grau de conversão, resistência à flexão e módulo flexural foram submetidos ao teste de aderência à curva normal e ao teste de homogeneidade de variância. Tendo sido todos os conjuntos de dados considerados normais e homocedásticos, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey para contraste entre as médias, com nível global de significância de 5 %.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

5.1.1 Difração de raio X

Os difratogramas (Figura 5.1) confirmam a existência de estruturas cristalinas, com picos de máxima intensidade em $11,6^\circ$, $20,9^\circ$, $23,6^\circ$, $29,3^\circ$, $35,5^\circ$ e 48° , característicos do DCPD ⁷⁰. A maior largura dos picos nas partículas sintetizadas sugere tamanho de cristalitos menores em relação ao composto comercial.

Figura 5.1 - Difratogramas dos compostos em análise. Na parte superior do gráfico o composto comercial, no centro o composto puro e na parte inferior da figura o composto funcionalizado, com os picos de máxima intensidade destacados com asteriscos

5.1.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 5.2 apresenta os espectros obtidos para as diferentes partículas de DCPD e para o TEGDMA. Para as partículas, observam-se pequenas bandas em 575 cm^{-1} , que correspondem às ligações P-O-P, e em 665 cm^{-1} , que são correspondentes à vibração da água. As bandas localizadas em 880 cm^{-1} e 980 cm^{-1} correspondem à ligação P-O. A banda em 1650 cm^{-1} corresponde ao grupo hidroxila, enquanto a banda em 2387 cm^{-1} é atribuída ao grupo HPO_4^{2-} . Além disso, foram observadas bandas em 3500 cm^{-1} correspondentes à água. Nas partículas funcionalizadas, foram identificadas bandas em comum com o TEGDMA em 1300 cm^{-1} (estiramento da ligação C-O), 1450 cm^{-1} (vibração em tesoura do CH_2) e 1730 cm^{-1} (estiramento da ligação C=O existente no grupo metacrilato). Por outro lado, as bandas em 2948 cm^{-1} (estiramento da ligação C-H do grupo C- CH_3) e 1189 cm^{-1} (flexão de C-O-C) presentes no espectro do TEGDMA não foram observadas no espectro das partículas funcionalizadas.

Figura 5.2 - Espectros obtidos por espectroscopia no infra-vermelho médio com transformada de Fourier, no modo de transmitância das partículas de DCPD e do TEGDMA

5.1.3 Análise elementar

O percentual de carbono detectado nas partículas comerciais e nas partículas puras foi de 0,09 e 0,12%, respectivamente. Estes valores são inferiores à resolução do equipamento e, portanto, considera-se não haver quantidades significativas de carbono nessas amostras. Por outro lado, nas partículas funcionalizadas a porcentagem de carbono detectada foi de 5,5%. Considerando que os átomos de carbono respondem por 58,7% da massa do TEGDMA, a porcentagem de TEGDMA na partícula ($\%_{\text{TEGDMA}} = \%_{\text{carbono}}/0,587$) corresponde a 9,4%.

5.1.4 Análise termogravimétrica

Os gráficos obtidos na análise termogravimétrica são apresentados na Figura 5.3. O pó comercial e as partículas puras apresentaram resultados muito semelhantes entre si. Por isso, são mostrados apenas os gráficos das partículas puras e funcionalizadas. A perda de massa observada entre 120 e 155 °C corresponde à eliminação das moléculas de água adsorvidas. Os percentuais eliminados nestas temperaturas correspondem, respectivamente, a 13% e 3% das massas iniciais das partículas funcionalizadas e puras. Entre 170 e 190 °C, observa-se uma perda de massa de 9,5% para as partículas funcionalizadas e de 17% para as puras, que corresponde à eliminação de água estrutural, resultando na transformação do DCPD em sua forma anidra (DCPA). Somente para as partículas funcionalizadas, observou-se perda de massa de aproximadamente 5% na temperatura próxima a 265 °C, correspondente à degradação do TEGDMA. E, finalmente, entre 380 °C e 430 °C para as todas partículas, ocorre a conversão do DCPA em pirofosfato, com uma perda de massa de 3%.

Figura 5.3 - Gráficos das análises termogravimétricas dos compostos puro (no topo da imagem) e funcionalizado (na parte inferior). Os gráficos mostram os percentuais de perda de massa em função do aumento da temperatura. Os eventos de maior interesse para caracterização dos compostos são destacados no gráfico para efeito de comparação entre os compostos

5.1.5 Isotermas de adsorção de nitrogênio / método BET

As isotermas de adsorção estão ilustradas na Figura 5.4. De acordo com a IUPAC, as partículas comerciais e puras podem ser classificadas como do tipo II, sendo não porosas ou macroporosas, com poros maiores que 50 nm, dado este observado pela área delimitada pelas curva de desorção e de adsorção. Por outro lado, as isotermas das partículas funcionalizadas podem ser classificadas como do tipo IV com histerese do tipo H3 devido a presença de agregados de partículas em forma de placas, resultando em poros do tipo fenda.

Figura 5.4 - Isotermas de adsorção de nitrogênio dos compostos puro (quadrados), comercial (triângulos) e funcionalizado (círculos). No gráfico constam as curvas de sorção e desorção de nitrogênio em função da variação da pressão parcial

A partir das isotermas de adsorção, foi calculada a área superficial específica das partículas empregando-se o método BET. As partículas funcionalizadas apresentaram área de superfície de 28,4 m²/g, cerca de três vezes maior que as partículas puras (8,4 m²/g) e mais de dez vezes maior que as partículas do composto comercial (2,7 m²/g).

5.1.6 Microscopia eletrônica de transmissão das partículas

As imagens obtidas em MET (Figura 5.5) mostram as partículas do composto comercial na forma de bastões com dimensões médias de 61 ± 17 nm no longo eixo e 15 ± 5 nm de largura, apresentando razão de aspecto de 4.0. As partículas puras se apresentam na forma esférica com diâmetro médio de 53 ± 33 nm. O composto funcionalizado apresenta partículas em forma de placas, como indicado pela isoterma de adsorção de nitrogênio, com dimensões de 63 ± 13 nm no longo eixo e 14 ± 4 nm de largura.

Figura 5.5 - Imagens obtidas em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 250 mil vezes. Nestas imagens, é possível identificar as diferentes morfologias das partículas de cada um dos compostos

5.1.7 Espalhamento de luz dinâmico

As distribuições de tamanho das partículas estão ilustradas na Figura 5.6. Através desta análise foi possível determinar os valores da mediana (D_{50}) do diâmetro dos aglomerados de partículas primárias, obtendo-se 0,67 μm para as partículas do composto comercial, 0,57 μm para as partículas puras e 0,07 μm para as partículas funcionalizadas. As partículas sintetizadas em laboratório apresentaram um menor intervalo de distribuição de tamanho quando comparadas as partículas comerciais.

Figura 5.6 - Distribuições de tamanho dos aglomerados de partículas, determinadas por espalhamento de luz dinâmico

5.2 EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS SOBRE AS PROPRIEDADES DE UM MATERIAL RESINOSO CONTENDO DCPD

Para esta segunda parte do trabalho, foi feita a síntese de um novo lote de partículas, cujo teor de carbono encontrado na análise elementar corresponde a 14 % de TEGDMA, portanto, maior do que a porcentagem encontrada nas partículas descritas no tópico anterior. O grupo controle da síntese nesta etapa foi representado por partículas sintetizadas com o composto CMC, totalmente removido após a síntese. Os resultados obtidos na caracterização por análise elementar, isoterma de adsorção (método BET) e espalhamento de luz dinâmico destes novos lotes de partículas, estão resumidos na Tabela 5.1. As partículas de DCPD funcionalizadas apresentaram percentual de carbono de 8% enquanto que as partículas não funcionalizadas apresentaram percentual de 0,3%. As partículas não funcionalizadas apresentaram área de superfície 35% maior (23,7 m²/g) que as partículas funcionalizadas (15,2 m²/g). Já o diâmetro médio das partículas, obtido por DLS, foi cerca de três vezes maior para o composto não funcionalizado (0,52 µm), quando comparado ao composto funcionalizado (0,17 µm).

Tabela 5.1 - Resultados da caracterização das partículas utilizadas na segunda etapa do estudo. Percentual de carbono (obtido pela análise elementar), área de superfície (método BET) e diâmetro médio dos aglomerados (obtido por espalhamento de luz dinâmico)

	DCPD funcionalizado	DCPD não funcionalizado
Percentual de carbono (%)	8,2	0,3
Área de superfície (m²/g)	15,2	23,7
D₅₀ (µm)	0,17	0,52

5.2.1 Liberação de íons

As concentrações de íons Ca²⁺ e HPO₄²⁻ dos materiais contendo 20% em volume de partículas de DCPD estão ilustrados na Figura 5.7. A análise de variância

de três fatores para as concentrações liberadas de cálcio (tendo como fatores principais tipo de partícula, pH do meio de imersão e período de imersão) mostrou que nenhuma das interações ou fatores principais foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A liberação de Ca^{2+} foi semelhante para os dois materiais e não foi afetada pelo pH do meio de imersão. Observa-se na Figura 5.7 uma tendência de diminuição nas concentrações liberadas ao longo do tempo. Porém, devido à elevada dispersão dos dados, com coeficientes de variação entre 31 e 98 %, não foi possível detectar diferenças estatisticamente significantes para esta variável. Os valores liberados variaram entre 0,30 mmol/L e 0,83 mmol/L.

Em relação à liberação de HPO_4^{2-} , os coeficientes de variação ficaram entre 3 e 34 % e observou-se interação estatisticamente significativa entre os fatores material e período de imersão ($p < 0,01$). Quando os dois materiais são comparados, observam-se concentrações duas vezes maiores de íons liberadas pelo material com partículas não funcionalizadas em todos os períodos. A liberação de íons HPO_4^{2-} a partir do material com partículas não funcionalizadas apresentou quedas significativas entre os períodos de 7, 14 e 21 dias, não apresentando diferença significativa entre 21 e 28 dias. O material com partículas funcionalizadas apresentou liberação de HPO_4^{2-} significativamente maior no período de 7 dias, enquanto que nos demais períodos (14, 21 e 28 dias) a concentração de íons manteve-se estável. O pH do meio de imersão não influenciou a liberação de íons HPO_4^{2-} .

Figura 5.7 - Valores de liberação de íons (em mmol/L) de materiais resinosos contendo 20 vol% de DCPD ao longo de 28 dias. Os quadrados representam o material com partículas não funcionalizadas e os círculos representam o material com partículas funcionalizadas. As cores vermelha e azul representam os materiais que ficaram imersos em solução com pH 5,5 e 7, respectivamente. Marcadores cheios indicam a liberação de cálcio e marcadores vazios indicam a liberação de fosfato. Barras de erro não foram incluídas no gráfico para não haver sobreposição de linhas, o que dificultaria a visualização

5.2.2 Propriedades ópticas

As médias e desvios-padrão dos valores de transmitância total e ΔE são ilustrados na Figura 5.8. Os materiais contendo partículas de sílica apresentaram valores de transmitância significativamente inferiores aos dos demais grupos ($p < 0,01$). Os valores de ΔE dos materiais contendo partículas não funcionalizadas e funcionalizadas foram semelhantes entre si. Em contrapartida, o material contendo partículas de sílica apresentou ΔE estatisticamente diferente dos demais ($p < 0,01$). A Figura 5.9 mostra o aspecto dos diferentes materiais avaliados.

Figura 5.8 - Médias e desvios padrão (representados pelas barras de erro) da transmitância total (em preto) e ΔE (em azul). Letras diferentes da mesma cor indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA/teste de Tukey, $p < 0,05$)

Figura 5.9 - Imagens dos corpos de prova utilizados nas análises de transmitância. Da esquerda para a direita: resina sem carga, resina + DCPD não funcionalizado, resina + DCPD funcionalizado e resina + sílica

5.2.3 Grau de conversão

Todos os grupos experimentais apresentaram graus de conversão estatisticamente semelhantes ($p = 0,416$). As médias e desvios-padrão são mostrados na Figura 5.10.

Figura 5.10 - Médias e desvios padrão (representados pelas barras de erro) obtidos para o grau de conversão dos materiais em estudo. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes (ANOVA/teste de Tukey, $p > 0,05$)

5.2.4 Resistência à flexão biaxial e módulo de elasticidade

Os resultados de resistência à flexão biaxial são mostrados na Figura 5.11, onde é possível observar que a funcionalização das partículas aumentou em 32% a resistência à flexão dos material em relação àquele contendo partículas de DCPD não funcionalizadas ($p < 0,05$). Porém, os dois materiais contendo DCPD apresentaram valores de resistência inferiores aos controles.

Figura 5.11 - Médias e desvios padrão (representados pelas barras de erro) obtidos para a resistência à flexão biaxial dos materiais em estudo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA/teste de Tukey, $p < 0,05$)

Os valores de módulo de elasticidade obtidos para os grupos experimentais estão apresentados na Figura 5.12. Os materiais contendo DCPD apresentaram valores de módulo de elasticidade estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$). O compósito com partículas de sílica apresentou módulo de elasticidade semelhante ao material contendo DCPD funcionalizado e à resina sem carga, que por sua vez apresentou o menor valor de módulo de elasticidade entre os grupos em estudo.

Figura 5.12 - Médias e desvios padrão (representados pelas barras de erro) obtidos para o módulo flexural dos materiais em estudo. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes (ANOVA/teste de Tukey, $p < 0,05$)

5.2.5 Análise microestrutural

5.2.5.1 Análise da superfície de fratura em microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas em MEV das superfícies de fratura dos materiais são mostradas na Figura 5.13. Os materiais contendo partículas funcionalizadas e não funcionalizadas apresentaram aspectos bastante semelhantes. Inúmeros aglomerados na forma de placas finas e comprimento da ordem de 29 μm são observados protruindo da matriz resinosa. Também podem ser vistas fendas resultantes da perda do aglomerado. O compósito contendo partículas de sílica coloidal apresentou partículas arredondadas com tamanhos entre 15 e 107 μm .

Figura 5.13 - Imagens dos materiais resinosos em estudo obtidas em microscopia eletrônica de varredura em *field emission gun* com aumento de 1350 vezes. A: resina + DCPD não Funcionalizado, B: resina + DCPD funcionalizado, C: resina + sílica

5.2.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Imagens das partículas obtidas em cortes ultrafinos do material resinoso podem ser vistas na Figura 5.14 com aumento de 100 mil vezes. A imagem A corresponde às partículas não funcionalizadas, apresentando morfologia de bastões com esferas ocas no seu interior, enquanto que em B vê-se as partículas funcionalizadas, que apresentam forma de placas.

Figura 5.14 - Imagens das partículas primárias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão, com aumento de 100 mil vezes. Estas imagens foram obtidas em cortes ultrafinos do material resinoso contendo 20 vol% de partículas. A: partículas não funcionalizadas, B: partículas funcionalizadas

6 DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

Na primeira parte deste estudo, foi descrito o processo de síntese de partículas de fosfato de cálcio funcionalizadas *ab initio* com TEGDMA. A funcionalização das partículas teve como objetivos reduzir a aglomeração em relação às partículas comerciais e puras, e produzir partículas com maior potencial de união a matrizes resinosas à base de dimetacrilatos. A baixa acidez do TEGDMA permite que, ao ser adicionado no momento da síntese, suas moléculas se liguem às partículas primárias do fosfato de cálcio por quimissorção, ao invés da adsorção física conseguida com a funcionalização pós-síntese. Desta forma, o TEGDMA impediria a coalescência das partículas adjacentes, reduzindo o tamanho dos agregados.

A composição das partículas foi confirmada pelos resultados obtidos por difração de raio X. O DCPD é uma fase encontrada em calcificações patológicas tais como cálculos dentais e renais ^{71, 72}, bem como uma das fases metaestáveis que precedem a formação da hidroxiapatita. Embora as evidências do papel do DCPD na mineralização fisiológica sejam questionáveis ⁴³, foi proposto que os cristais de DCPD podem servir como modelos para o crescimento epitaxial da hidroxiapatita ⁷³. Além disso, este composto foi identificado nas etapas iniciais da precipitação *in vitro*, em condições ligeiramente ácidas ⁷⁴.

O TEGDMA é um monômero com característica hidrofílica comumente utilizado em formulações de materiais resinosos como um diluente de monômeros orgânicos com maior peso molecular. Este monômero alifático favorece a formação de rede poliméricas mais densas, devido alta reatividade e flexibilidade da molécula. No entanto, sua alta flexibilidade favorece a formação de redes poliméricas bastante heterogêneas, com a ocorrência de ciclização primária, o que facilita a absorção de água ^{75, 76}. O fato desse monômero facilitar o acesso da água ao polímero é de grande interesse na formulação de materiais resinosos bioativos, pois a liberação dos íons é dependente da capacidade do material absorver a água e promover a dissolução dos compostos de fosfato de cálcio no interior do polímero.

A presença de TEGDMA na superfície das partículas foi confirmada através das diferentes técnicas utilizadas no estudo. Os resultados obtidos por FTIR mostraram bandas de absorção comuns entre o TEGDMA e as partículas funcionalizadas, tais como em 1300 cm^{-1} (estiramento da ligação C-O), 1450 cm^{-1} (vibração em tesoura de CH_2) e 1730 cm^{-1} (C=O , estiramento do metacrilato), as quais não foram encontradas nas partículas puras e comerciais. O possível mecanismo de quimissorção entre o TEGDMA e o DCPD envolve átomos de oxigênio dos grupos oxietileno ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$) presentes no TEGDMA, que atraem cargas positivas dos íons cálcio presentes no DCPD por meio de uma interação íon-dipolo ⁷⁷. A supressão da banda em 1189 cm^{-1} (flexão do C-O-C) suporta esta hipótese. Além disso, a supressão da banda localizada em 2948 cm^{-1} sugere um outro mecanismo de interação, desta vez envolvendo os grupos terminais $-\text{CH}_3$ e a superfície da partícula, no qual os grupos terminais $-\text{CH}_3$ liberariam íons H^+ , formando carbânions ($-\text{CH}_2^-$) estabilizados por ressonância com a ligação σ - π aberta do grupo vinila, os quais se unem ao cálcio. O equilíbrio entre estas duas formas de interação pode explicar as diferentes morfologias das partículas primárias observadas ao MET (Figura 5.5).

Como previsto, as partículas recobertas com TEGDMA apresentaram área superficial significativamente maior quando comparadas com as partículas de DCPD puro e às partículas comerciais. Este achado concorda com o menor tamanho médio dos aglomerados observado pela análise DLS. Com relação ao DLS, deve ser ressaltado que a distribuição de tamanhos encontrada representa apenas os aglomerados que se encontravam em suspensão no momento da leitura. Muito provavelmente, aglomerados maiores começaram a decantar imediatamente após a retirada da amostra do ultrassom. Não obstante, de modo comparativo, essa análise apresenta resultados que são importantes para complementar as informações das outras análises realizadas.

A menor aglomeração e maior área superficial encontrada para as partículas funcionalizadas constituem uma característica altamente desejável em biomateriais com função remineralizante, uma vez que uma maior área superficial favorece a liberação de íons ²⁵. Tentativas anteriores de síntese de partículas de ACP com a adição *ab initio* de compostos de elevada massa molecular, como o poli(óxido de etileno) (PEO), não demonstraram redução da aglomeração das partículas, provavelmente pela formação de “pontes de polímeros” entre os íons Ca^{2+} e os grupos

carboxílicos do PEO ³². A formação dessas pontes com a utilização de TEGDMA é menos provável, pois este monômero apresenta peso molecular relativamente baixo (286 g/mol).

6.2 EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS SOBRE AS PROPRIEDADES DE UM MATERIAL RESINOSO CONTENDO DCPD

6.2.1 Liberação de íons

Na segunda parte do estudo, foi avaliado o efeito da adição de partículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA em uma matriz resinosa composta por 1:1 em mols de BisGMA e TEGDMA. Os materiais foram formulados com 20% em volume de partículas de DCPD, o que corresponde à aproximadamente a 40% em massa. Este percentual foi definido com base em estudos anteriores que verificaram que a liberação de íons aumenta com o acréscimo de percentual de partículas numa relação representada por uma função potência a partir de 15% em volume ou cerca de 35% em peso ^{41, 51}. A concentração de íons liberados aumenta com o acréscimo do percentual de CaP no compósito porque aumenta-se a fonte de íons disponíveis, além de proporcionar mais interfaces partícula/matriz, facilitando a difusão de água. Há, ainda, uma terceira justificativa relacionando o aumento percentual dessas partículas com a diminuição do grau de conversão do polímero, que facilitaria a liberação de íons ⁵¹. Com base nestes estudos, diversos trabalhos utilizaram 40% em peso de partículas de fosfato de cálcio nas formulações testadas ^{16, 18, 32, 52-56}. Porém a concentração de íons liberados é dependente de outros elementos como o tamanho das partículas, o pH do meio de imersão e a composição da matriz resinosa ^{20, 55, 57}.

A funcionalização das partículas fosfato de cálcio pode comprometer sua capacidade de atuar como fonte de íons para a remineralização. Por exemplo, estudos anteriores demonstraram que a silanização das partículas de CaP com o objetivo de melhorar sua união à matriz resinosa provoca uma redução de até 50% na concentração de íons liberada, afetando principalmente a liberação de íons Ca^{2+} ^{25, 27}.

Por outro lado, a funcionalização das partículas de DCPD com TEGDMA no presente trabalho não apresentou influência sobre a liberação de íons Ca^{2+} . O monômero funcionalizante, diferentemente do silano, apresenta características hidrofílicas, permitindo o acesso da água às partículas bioativas. Em contrapartida, a liberação de íons HPO_4^{2-} foi significativamente maior (cerca de 50%) para o material com partículas não funcionalizadas.

A maior liberação de íons HPO_4^{2-} pelo material contendo partículas não funcionalizadas pode ser atribuída à sua área de superfície, 36% maior ($23,7 \text{ m}^2/\text{g}$) que as partículas funcionalizadas ($15,2 \text{ m}^2/\text{g}$). Isso sugere que o CMC mostrou um bom efeito surfactante, reduzindo o tamanho das partículas e resultando na formação de aglomerados porosos, o que favoreceu a liberação de íons. Por outro lado, através da análise de DLS, foi observado que as partículas funcionalizadas formam agregados menores ($0,17 \text{ }\mu\text{m}$) em relação às partículas não funcionalizadas ($0,52 \text{ }\mu\text{m}$). Essa aparente divergência entre os resultados do DLS e da área superficial pode ser justificada pelo fato de que as partículas não funcionalizadas formam aglomerados porosos, o que aumenta sua área superficial. Porém a análise por DLS determina o raio hidrodinâmico do aglomerado (definido pela rotação da partícula em todas as direções somada à camada de hidratação) e, portanto, não leva em consideração a porosidade dos aglomerados.

A liberação de íons Ca^{2+} após 7 dias variou entre 0,86 e 0,68 mmol/L, enquanto que os valores de íons HPO_4^{2-} ficaram entre 0,44 e 0,25 mmol/L. No presente trabalho observou-se que os valores de liberação de íons Ca^{2+} são superiores aos de íons HPO_4^{2-} . Isto ocorre porque as partículas de DCPD são formadas por tetraedros de HPO_4^{2-} que apresentam uma função estruturante no composto. Assim, este íon poliatômico apresenta uma maior dificuldade para sair do material resinoso para a solução. A maior liberação de íons Ca^{2+} corrobora com resultados encontrados na literatura que utilizaram outros fosfatos de cálcio (ACP e TTCP) ^{15, 20, 21, 41, 59, 78}. A maior liberação desses compostos de cálcio (ACP e TTCP) pode ser justificada, também pela razão Ca/P desses fosfatos de cálcio, que apresentam-se superiores a 1, o que significa que há mais átomos de cálcio presente na estrutura do composto que átomos de fósforo. Em contrapartida, estudos que avaliaram a liberação de íons a partir de compósitos contendo partículas de DCPA encontraram valores de liberação de íons

HPO₄²⁻ superiores aos valores obtidos para os íons Ca²⁺, porém os trabalhos não relatam quais seriam as possíveis justificativas para tal achado ^{25, 58, 59}.

A liberação de íons não se manteve de forma sustentada ao longo do tempo. A liberação de íons HPO₄²⁻ para o grupo não funcionalizado apresentou reduções significativas entre períodos sucessivos de imersão até 21 dias. Entre 7 e 14 dias ocorreram reduções de 59% para o material com partículas não funcionalizadas e 70% para o material funcionalizado. Para os íons Ca²⁺ não foi observada diferença significativa entre os períodos de avaliação, porém, de modo geral, houve uma tendência de diminuição nos valores de liberação de íons Ca²⁺ ao longo do tempo, o que também é observado em outros estudos ^{15, 20, 21, 51, 58, 79}.

Uma comparação direta entre os valores de Ca²⁺ e HPO₄²⁻ liberados pelos materiais deste trabalho e dados existentes na literatura não é possível, visto que há diferenças evidentes no delineamento dos trabalhos, como por exemplo, o percentual e tipo de partícula de CaP e a composição da matriz orgânica do compósito. Um estudo *in vitro* avaliando a remineralização de lesões artificiais em esmalte com um compósito contendo 40% em massa de partículas de ACP em pH neutro relata valores de 0,74 mmol/L para liberação de íons Ca²⁺ e 0,54 mmol/L para íons HPO₄²⁻ e uma recuperação mineral de 14,4% após 28 dias ¹⁵. Em condições de avaliação semelhantes ao do trabalho citado (dados cumulativos ao longo de 28 dias e pH 7) no presente trabalho, foi observada uma concentração de íons Ca²⁺ de 2,66 e 2,35 mmol/L para os materiais com partículas funcionalizadas e não funcionalizadas, respectivamente. E em relação aos íons HPO₄²⁻, foi observada uma liberação de 0,43 mmol/L para o material funcionalizado e 0,82 mmol/L para o grupo não funcionalizado. Assim, pode-se especular que os materiais em estudo seriam capazes de promover remineralização dentária.

Trabalhos anteriores relataram a influência do pH do meio de imersão sobre a liberação de íons. O fato de materiais resinosos contendo fosfatos de cálcio liberarem concentrações significativamente maiores de íons em condições de maior acidez os qualifica como “materiais inteligentes” ^{20, 21}. Porém, neste trabalho o pH das soluções tamponadas (7,0 e 5,5) não exerceu efeito sobre a liberação de íons. A relação volume de solução/corpo de prova, assim como as soluções tamponadas foram preparadas conforme descrito em estudos anteriores ^{21, 25}. Porém, o pH das soluções onde os corpos de prova estavam imersos foi monitorado diariamente e observou-se que, após

24 horas de imersão, a solução com pH inicial de 7 variou entre 5,8 e 6,7, já a solução de pH inicial 5,5, variou de 5,1 a 6,0. O DCPD, assim como o fosfato octacálcico (OCP), são considerados fosfatos de cálcio “ácidos”. Assim, sua dissolução tenderia a equilibrar o pH do meio, o que pode ter prejudicado a avaliação deste fator de variação.

6.2.2 Propriedades ópticas e grau de conversão

A incorporação de partículas de diferentes CaP em matrizes resinosas pode representar um problema no que se refere à fotoativação ²⁸. Isso ocorre, por exemplo, com partículas de HA, que apresentam índice de refração (entre 1,63 e 1,67) superior ao da matriz orgânica (entre 1,50 e 1,55) ²³. O DCPD apresenta índice de refração entre 1,54 e 1,55. Portanto, sendo a razão entre os índices de refração das partículas e da matriz orgânica próximo de 1, a presença das partículas não representa uma dificuldade para a passagem da luz. Em contrapartida, as partículas de sílica (índice de refração: 1,46) quando adicionadas na matriz orgânica diminuíram em cerca de três vezes os valores de transmitância. A incorporação de partículas de DCPD demonstrou não promover alterações significativas na cor do material em relação à resina sem carga (Figura 5.9), enquanto que o compósito contendo partículas de sílica apresentou alteração de cor evidente.

Os materiais em estudo apresentaram graus de conversão estatisticamente semelhantes, o que significa que a incorporação de 20% em volume de partículas de sílica ou de DCPD, funcionalizadas ou não, não afetou a formação da rede polimérica. Mesmo com valor de transmitância significativamente menor que os demais materiais resinosos, o compósito contendo sílica apresentou grau de conversão semelhante aos demais materiais provavelmente porque a espessura do corpo de prova, em torno de 1 mm, permitiu a fotoativação do material. O fato dos materiais terem apresentado graus de conversão semelhantes foi importante para garantir que as diferenças encontradas nos ensaios mecânicos pudessem ser atribuídas à diferenças na microestrutura dos materiais, e não a variações na qualidade da rede polimérica.

6.2.3 Propriedades mecânicas e análise microestrutural

As partículas de DCPD quando inseridas numa matriz resinosa não se comportam como uma fase de reforço e, portanto, necessitam ser associadas a outros elementos que proporcionem ao material propriedades mecânicas compatíveis com o pretendido para o uso clínico ⁷⁸. Isso fica evidente pelo fato dos materiais contendo DCPD terem apresentado resistência à fratura inferior à da resina sem carga. Este fato é justificado pelo fato das partículas de DCPD não apresentarem nenhum tipo de interação com a matriz resinosa dos compósitos e, assim, as partículas se comportam como poros ou defeitos dentro do material, que concentram tensões em sua interface levando à fratura sob tensões relativamente baixas ²².

Não obstante, a incorporação de partículas funcionalizadas à resina resultou em um material com resistência à flexão biaxial 32% maior que aquela apresentada pelo material contendo DCPD não funcionalizado. Os melhores resultados alcançados pelo material com partículas funcionalizadas pode ser atribuído a uma melhor interação entre as partículas de DCPD e a fase orgânica do material, que minimiza a concentração tensões na interface matriz/partícula e dificulta a propagação de trincas no material e/ou pelo menor tamanho dos agregados de partículas funcionalizadas, o que significaria poros ou defeitos menores no material.

De modo semelhante ao que foi discutido no tópico de liberação de íons, não é possível realizar uma comparação direta dos resultados obtidos neste trabalho com outros trabalhos da literatura que avaliaram o efeito da funcionalização de partículas de fosfato de cálcio. Assim, guardadas as limitações da análise comparativa, estudos anteriores relatam que um material contendo partículas de HA silanizadas (32-42 % em peso) apresentaram resistência à flexão em três pontos 22% maior do que um material contendo partículas não silanizadas ²³. Em outro estudo, a utilização do ácido acrílico como agente de ligação entre partículas de HA adicionadas à resina em uma proporção de 35% em volume resultou valores de resistência à flexão de 75% maiores em comparação ao material com partículas não funcionalizadas ²⁸. Em outro exemplo, a silanização de partículas de DCPA resultou em um aumento de 60% na resistência à flexão de um material contendo 65% (em peso) de partículas em relação ao material contendo partículas não silanizadas ²⁵.

O aumento observado nos valores de resistência à flexão com a funcionalização das partículas de DCPD não foi tão representativo como na maioria dos trabalhos descritos acima. Porém, é importante destacar que em alguns estudos a liberação de íons não foi avaliada ²⁸ ou a liberação de íons do material foi severamente prejudicada pela silanização ²⁵. Já a modificação da superfície da partículas com o TEGDMA promoveu um aumento menos expressivo nos valores de resistência à flexão do material, mas o reforço mecânico obtido não comprometeu a liberação de íons Ca^{2+} .

O módulo de elasticidade dos materiais não foi influenciado pela funcionalização das partículas. Aparentemente, esta propriedade está relacionada à rigidez das partículas e à forma como estas interagem entre si no material ⁸⁰, não importando a união entre partículas e matriz. Este resultado concorda com um estudo anterior no qual adições sucessivas de partículas de TTCP em uma matriz resinosa (de zero a 70% em peso) resultou em reduções na resistência à flexão e aumentos no módulo de elasticidade ²¹. A falta de uma maior interação entre os aglomerados de sílica, com grandes áreas de resina sem carga entre eles (Figura 5.13) explicaria o fato do módulo de elasticidade deste compósito ter sido estatisticamente semelhante ao da resina sem carga.

A síntese de partículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA foi realizada com êxito. O monômero funcionalizante controlou o crescimento das partículas, diminuindo o tamanho dos aglomerados, o que representa um aspecto positivo no que se refere à liberação de íons. Além disso, a funcionalização favoreceu a interação entre as partículas de DCPD e a matriz orgânica dos materiais, evidenciado pelo aumento no valor de resistência à flexão, sem redução substancial na liberação de íons cálcio do material. Entretanto, não foi possível avaliar se a funcionalização das partículas apresentou efeitos sobre a dispersão e aglomeração das partículas quando inseridas na matriz resinosa, as imagens obtidas em MEV não permitem realizar esta análise com precisão. Há outras metodologias que são capazes de verificar este efeito, como o espalhamento de raio X a baixo ângulo (SAXS) ⁸¹.

Outros estudos serão realizados para avaliar o efeito de outros monômeros vinílicos na funcionalização de partículas de CaP com o objetivo de se obter partículas menores, com menor aglomeração e capazes de compatibilizar a liberação de íons em concentração elevadas e melhores propriedades mecânicas. Além disso, deve-se

avaliar a incorporação de partículas de reforço associadas às partículas bioativas, a fim de se obter formulações com propriedades mecânicas compatíveis com o uso como materiais restauradores.

7 CONCLUSÕES

Como base no exposto, é possível concluir que:

- Partículas de fosfato dicálcico dihidratado funcionalizadas *ab initio* com TEGDMA foram sintetizadas e caracterizadas, e um mecanismo de interação através de quimissorção entre o DCPD e o monômero foi proposto. As partículas funcionalizadas apresentaram maior área superficial e aglomerados menores, quando comparadas a um pó comercial e a partículas sintetizadas sem a adição de TEGDMA.
- Quando 20% (em volume) de partículas funcionalizadas foram incorporadas a uma matriz resinosa, a liberação de íons Ca^{2+} foi estatisticamente semelhante àquela obtida com partículas não funcionalizadas, enquanto que a liberação de HPO_4^{2-} foi 51% menor. As propriedades ópticas e o grau de conversão dos materiais contendo DCPD (funcionalizado ou não) foram semelhantes àsquelas da resina sem carga. Finalmente, a funcionalização resultou em um aumento de 32% na resistência à fratura em relação ao material contendo DCPD não funcionalizado e não afetou o módulo de elasticidade do material resinoso.

REFERÊNCIAS²

1. Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 1994.
2. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*. 2008;28(7):1319-27.
3. Eppele M, Ganesan K, Heumann R, Klesing J, Kovtun A, Neumann S, et al. Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *Journal of Materials Chemistry*. 2010;20(1):18-23.
4. Bonfield W, Grynpas MD, Tully AE, Bowman J, Abram J. Hydroxyapatite reinforced polyethylene--a mechanically compatible implant material for bone replacement. *Biomaterials*. 1981;2(3):185-6.
5. Lee DD, Tofighi A, Aiolo M, Chakravarthy P, Catalano A, Majahad A, et al. alpha-BSM: a biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle. *Clin Orthop Relat Res*. 1999(367 Suppl):S396-405.
6. Malchiodi L, Ghensi P, Cucchi A, Trisi P, Szmukler-Moncler S, Corrocher G, et al. Early bone formation around immediately loaded FBR-coated implants after 8, 10 and 12 weeks: a human histologic evaluation of three retrieved implants. *Minerva Stomatol*. 2011;60(4):205-16.
7. Arsic J, Kaminski D, Poodt P, Vlieg E. Liquid ordering at the Brushite-{010}-water interface. *Physical Review B*. 2004;69(24).
8. Zhong B, Peng C, Wang G, Tian L, Cai Q, Cui F. Contemporary research findings on dentine remineralization. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013.
9. Kozlova D, Chernousova S, Knuschke T, Buer J, Westendorf AM, Eppele M. Cell targeting by antibody-functionalized calcium phosphate nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*. 2012;22(2):396-404.
10. Roy I, Mitra S, Maitra A, Mozumdar S. Calcium phosphate nanoparticles as novel non-viral vectors for targeted gene delivery. *Int J Pharm*. 2003;250(1):25-33.

² De acordo com o Estilo Vancouver.

11. Ivanoff CS, Hottel TL, Garcia-Godoy F. Microhardness recovery of demineralized enamel after treatment with fluoride gel or CPP-ACP paste applied topically or with dielectrophoresis. *Am J Dent*. 2012;25(2):109-13.
12. Jo SY, Chong HJ, Lee EH, Chang NY, Chae JM, Cho JH, et al. Effects of various toothpastes on remineralization of white spot lesions. *Korean J Orthod*. 2014;44(3):113-8.
13. Grobler SR, Majeed A, Moola MH, Rossouw RJ, van Wyk Kotze T. In vivo Spectrophotometric Assessment of the Tooth Whitening Effectiveness of Nite White 10% with Amorphous Calcium Phosphate, Potassium Nitrate and Fluoride, Over a 6-month Period. *Open Dent J*. 2011;5:18-23.
14. Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dent Mater*. 2011;27(1):29-38.
15. Langhorst SE, O'Donnell JN, Skrtic D. In vitro remineralization of enamel by polymeric amorphous calcium phosphate composite: quantitative microradiographic study. *Dent Mater*. 2009;25(7):884-91.
16. Weir MD, Chow LC, Xu HH. Remineralization of demineralized enamel via calcium phosphate nanocomposite. *J Dent Res*. 2012;91(10):979-84.
17. Dickens SH, Flaim GM, Takagi S. Mechanical properties and biochemical activity of remineralizing resin-based Ca-PO₄ cements. *Dent Mater*. 2003;19(6):558-66.
18. Skrtic D, Hailer AW, Takagi S, Antonucci JM, Eanes ED. Quantitative assessment of the efficacy of amorphous calcium phosphate/methacrylate composites in remineralizing caries-like lesions artificially produced in bovine enamel. *J Dent Res*. 1996;75(9):1679-86.
19. Melo MA, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel calcium phosphate nanocomposite with caries-inhibition in a human in situ model. *Dent Mater*. 2013;29(2):231-40.
20. Xu HH, Weir MD, Sun L. Calcium and phosphate ion releasing composite: effect of pH on release and mechanical properties. *Dent Mater*. 2009;25(4):535-42.
21. Xu HH, Moreau JL. Dental glass-reinforced composite for caries inhibition: calcium phosphate ion release and mechanical properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;92(2):332-40.

22. Du MZ, Y. Modification of silica nanoparticles and their application in UDMA dental polymeric composites. *Polymer Composites*. 2007;28(2):10.
23. Labella R, Braden M, Deb S. Novel hydroxyapatite-based dental composites. *Biomaterials*. 1994;15(15):1197-200.
24. Xu HH, Quinn JB. Whisker-reinforced bioactive composites containing calcium phosphate cement fillers: effects of filler ratio and surface treatments on mechanical properties. *J Biomed Mater Res*. 2001;57(2):165-74.
25. Xu HH, Weir MD, Sun L. Nanocomposites with Ca and PO₄ release: effects of reinforcement, dicalcium phosphate particle size and silanization. *Dent Mater*. 2007;23(12):1482-91.
26. O'Donnell JN, Schumacher GE, Antonucci JM, Skrtic D. Structure-Composition-Property Relationships in Polymeric Amorphous Calcium Phosphate-Based Dental Composites. *Materials (Basel)*. 2009;2(4):1929-59.
27. Chen WC, Wu HY, Chen HS. Evaluation of reinforced strength and remineralized potential of resins with nanocrystallites and silica modified filler surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(3):1143-51.
28. Arcis RW, Lopez-Macipe A, Toledano M, Osorio E, Rodriguez-Clemente R, Murtra J, et al. Mechanical properties of visible light-cured resins reinforced with hydroxyapatite for dental restoration. *Dent Mater*. 2002;18(1):49-57.
29. Liu Q, de Wijn JR, de Groot K, van Blitterswijk CA. Surface modification of nanoapatite by grafting organic polymer. *Biomaterials*. 1998;19(11-12):1067-72.
30. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Amorphous Calcium Phosphate-based bioactive polymeric composites for mineralized tissue regeneration. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. 2003;108(3):15.
31. Ellis J, Jackson AM, Scott RP, Wilson AD. Adhesion of carboxylate cements to hydroxyapatite. III. Adsorption of poly(alkenoic acids). *Biomaterials*. 1990;11(6):379-84.
32. Antonucci JM, Liu DW, Skrtic D. Amorphous Calcium Phosphate Based Composites: Effect of Surfactants and Poly(ethylene oxide) on Filler and Composite Properties. *J Dispers Sci Technol*. 2007;28(5):819-24.

33. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chem Rev.* 2008;108(11):4628-69.
34. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates - Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomater.* 2011;1(2):121-64.
35. LeGeros RZ. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Myers HM, editor: Karger; 1991.
36. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. *J Dent Res.* 2010;89(11):1187-97.
37. Combes C, Rey C. Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomater.* 2010;6(9):3362-78.
38. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED, Brunworth RT. Silica- and zirconia-hybridized amorphous calcium phosphate: effect on transformation to hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(4):597-604.
39. Antonucci JM, O'Donnell JN, Schumacher GE, Skrtic D. Amorphous Calcium Phosphate Composites and Their Effect on Composite-Adhesive-Dentin Bonding. *Journal of Adhesion Science and Technology.* 2009;23(7):1133-47.
40. O'Donnell JN, Antonucci JM, Skrtic D. Amorphous calcium phosphate composites with improved mechanical properties. *J Bioact Compat Polym.* 2006;21(3):169-84.
41. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Improved properties of amorphous calcium phosphate fillers in remineralizing resin composites. *Dent Mater.* 1996;12(5):295-301.
42. Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials.* 2009;2:100.
43. Johnsson MS, Nancollas GH. The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992;3(1-2):61-82.
44. Pan HB, Darvell BW. Solubility of dicalcium phosphate dihydrate by solid titration. *Caries Res.* 2009;43(4):254-60.
45. Larsen MJ, Pearce EI. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Arch Oral Biol.* 2003;48(4):317-22.

46. Manton DJ, Walker GD, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by the use of three commercially available sugar-free gums. *Int J Paediatr Dent*. 2008;18(4):284-90.
47. Silva KG, Pedrini D, Delbem AC, Ferreira L, Cannon M. In situ evaluation of the remineralizing capacity of pit and fissure sealants containing amorphous calcium phosphate and/or fluoride. *Acta Odontol Scand*. 2010;68(1):11-8.
48. Torwane NA, Hongal S, Goel P, Chandrashekar BR, Jain M, Saxena E. A clinical efficacy of 30% ethenolic extract of Indian propolis and Recaldent in management of dentinal hypersensitivity: A comparative randomized clinical trial. *Eur J Dent*. 2013;7(4):461-8.
49. Chow CK, Wu CD, Evans CA. In vitro properties of orthodontic adhesives with fluoride or amorphous calcium phosphate. *Int J Dent*. 2011;2011:583521.
50. Antonucci JM, Misra DN, Peckoo RJ. The Accelerative and Adhesive Bonding Capabilities of Surface-Active Accelerators. *J Dent Res*. 1981;60(7):1332-42.
51. Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, et al. Strong nanocomposites with Ca, PO(4), and F release for caries inhibition. *J Dent Res*. 2010;89(1):19-28.
52. Moreau JL, Sun L, Chow LC, Xu HH. Mechanical and acid neutralizing properties and bacteria inhibition of amorphous calcium phosphate dental nanocomposite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;98(1):80-8.
53. Lee SY, Regnault WF, Antonucci JM, Skrtic D. Effect of particle size of an amorphous calcium phosphate filler on the mechanical strength and ion release of polymeric composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80(1):11-7.
54. Antonucci JM, Fowler BO, Stansbury JW, Weir MD, Skrtic D. Bioactive Polymeric ACP Composites Utilizing Ethyl-alpha-hydroxymethylacrylate. *Polymer Prepr*. 2008;49(1):820-21.
55. Antonucci JM, Skrtic D. Fine-Tuning of Polymeric Resins and Their Interfaces with Amorphous Calcium Phosphate. A Strategy for Designing Effective Remineralizing Dental Composites. *Polymers (Basel)*. 2010;2(4):378-92.
56. Park MS, Eanes ED, Antonucci JM, Skrtic D. Mechanical properties of bioactive amorphous calcium phosphate/methacrylate composites. *Dent Mater*. 1998;14(2):137-41.

57. Xu HH, Weir MD, Sun L, Takagi S, Chow LC. Effects of calcium phosphate nanoparticles on Ca-PO₄ composite. *J Dent Res*. 2007;86(4):378-83.
58. Xu HH, Weir MD, Sun L, Ngai S, Takagi S, Chow LC. Effect of filler level and particle size on dental caries-inhibiting Ca-PO₄ composite. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(8):1771-9.
59. Xu HH, Sun L, Weir MD, Antonucci JM, Takagi S, Chow LC, et al. Nano DCPA-whisker composites with high strength and Ca and PO₄ release. *J Dent Res*. 2006;85(8):722-7.
60. Uysal T, Amasyali M, Koyuturk AE, Ozcan S, Sagdic D. Amorphous calcium phosphate-containing orthodontic composites. Do they prevent demineralisation around orthodontic brackets? *Aust Orthod J*. 2010;26(1):10-5.
61. Xu HH, Sun L, Weir MD, Takagi S, Chow LC, Hockey B. Effects of incorporating nanosized calcium phosphate particles on properties of whisker-reinforced dental composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;81(1):116-25.
62. Moreau JL, Weir MD, Giuseppetti AA, Chow LC, Antonucci JM, Xu HH. Long-term mechanical durability of dental nanocomposites containing amorphous calcium phosphate nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(5):1264-73.
63. Marovic D, Tarle Z, Hiller KA, Muller R, Ristic M, Rosentritt M, et al. Effect of silanized nanosilica addition on remineralizing and mechanical properties of experimental composite materials with amorphous calcium phosphate. *Clin Oral Investig*. 2014;18(3):783-92.
64. Marovic D, Tarle Z, Hiller KA, Muller R, Rosentritt M, Skrtic D, et al. Reinforcement of experimental composite materials based on amorphous calcium phosphate with inert fillers. *Dent Mater*. 2014;30(9):1052-60.
65. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED, Eidelman N. Dental composites based on hybrid and surface-modified amorphous calcium phosphates. *Biomaterials*. 2004;25(7-8):1141-50.
66. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc*. 1938;60:309-19.
67. CIE, editor. Colorimetry – technical report. . Commission Internationale de l'Éclairage; 2004; Vienna, Austria: Bureau Central de la CIE.

68. Chung SM, Yap AU, Koh WK, Tsai KT, Lim CT. Measurement of Poisson's ratio of dental composite restorative materials. *Biomaterials*. 2004;25(13):2455-60.
69. Timoshenko SP W-KS. Theory of plates and shells. Theory of plates and shells. New York: McGraw-Hill; 1959.
70. PDF#09-0077. Joint Committee on Powder Diffraction Standards. In: Data ICfD, editor. PDF#09-0077, DCPD.
71. Ackermann D, Baumann JM. Chemical factors governing the state of saturation towards brushite and whewellite in urine of calcium stone formers. *Urol Res*. 1987;15(2):63-5.
72. Legeros RZ, Shannon IL. The crystalline components of dental calculi: human vs. dog. *J Dent Res*. 1979;58(12):2371-7.
73. Francis MD, Webb NC. Hydroxyapatite Formation from a Hydrated Calcium Monohydrogen Phosphate Precursor. *Calcified Tissue Research*. 1971;6(4):335-&.
74. van Kemenade MJJM, de Bruyn PL. A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. *J Colloid Interface Sci*. 1987;118(2):564-85.
75. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 2003;24(4):655-65.
76. Pfeifer CS, Silva LR, Kawano Y, Braga RR. Bis-GMA co-polymerizations: influence on conversion, flexural properties, fracture toughness and susceptibility to ethanol degradation of experimental composites. *Dent Mater*. 2009;25(9):1136-41.
77. Yoshida Z, Kihara S. The Role of Nonionic Polyoxyethylene Ether Surfactants on Ion Transfer across Aqueous Organic Solution Interfaces Studied by Polarography with the Electrolyte Dropping Electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1987;227(1):171-81.
78. Xu HH, Moreau JL, Sun L, Chow LC. Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition. *Dent Mater*. 2011;27(8):762-9.
79. Skrtic D, Antonucci JM, Liu DW. Ethoxylated bisphenol dimethacrylate-based amorphous calcium phosphate composites. *Acta Biomater*. 2006;2(1):85-94.

80. Braga RR, Yamamoto T, Tyler K, Boaro LC, Ferracane JL, Swain MV. A comparative study between crack analysis and a mechanical test for assessing the polymerization stress of restorative composites. *Dent Mater.* 2012;28(6):632-41.
81. Fratzl P, Fratzl-Zelman N, Klaushofer K, Vogl G, Koller K. Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small-angle X-ray scattering. *Calcif Tissue Int.* 1991;48(6):407-13.

APÊNDICE A – Dados utilizados para formulação dos materiais experimentais d

Para formulação dos compósitos com as proporções em massa, foi necessária a determinação das densidades diferentes partículas de DCPD (Tabela apêndice 1). A densidade teórica das partículas foi determinada em um picnômetro à hélio como descrito no item 4.3.2 no capítulo Materiais e Métodos.

Tabela apêndice 1 - Média dos valores de densidade teórica das partículas utilizadas na segunda etapa do estudo

	Sílica	DCPD não funcionalizado	DCPD funcionalizado
Densidade teórica (g/cm³)	2,25	2,64	2,38

Além da análise da densidade teórica dos compostos inorgânicos, foi calculada a densidade da matriz orgânica resinosa utilizada. Para tanto, as massas dos monômeros BisGMA e TEGDMA foram somadas e divididas pela soma dos seus volumes, que por sua vez foi calculado através dos valores de densidade dos monômeros 1,61 e 1,09 g/cm³ para o BisGMA e TEGDMA, respectivamente.

A formulação dos compósitos foram calculadas mantendo-se 80% do volume dos compósitos de matriz orgânica e 20% do volume de partículas de inorgânicas (Tabela apêndice 2).

Tabela apêndice 2 - Composição e formulação dos materiais em estudo na segunda etapa do estudo. Quantidades em massa e volume de cada um dos compostos das diferentes formulações

	Composto	Quantidade em massa (g)	Quantidade em volume (mL)
Matriz orgânica	BisGMA	3,75	2,33
	TEGDMA	2,10	1,93
	Amina terciária	0,29	-
	Canforoquinona	0,29	-
Fase inorgânica	Partículas de DCPD funcionalizadas	2,53	1,065
	ou		
	Partículas de DCPD não funcionalizadas	2,81	1,065
	ou		
	Partículas de sílica	2,40	1,065