MARIEL SOEIRO MAAS

Efeito da adição de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) sobre as propriedades mecânicas e liberação de íons após imersão prolongada de compósitos experimentais

São Paulo
2017

MARIEL SOEIRO MAAS

Efeito da adição de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) sobre as propriedades mecânicas e liberação de íons após imersão prolongada de compósitos experimentais

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia Biomateriais e Biologia oral para obter o título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga

São Paulo

2017

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-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Maas, Mariel Soeiro.

Efeito da adição de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) sobre as propriedades mecânicas e liberação de íons após imersão prolongada de compósitos experimentais / Mariel Soeiro Maas ; orientador Roberto Ruggiero Braga. -- São Paulo, 2017.

72 p. : fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biomateriais e Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Fosfatos de Cálcio. 2. Propriedades mecânicas. 3. Liberação de íons. 4. Resinas dentárias. I. Braga, Roberto Ruggiero. II. Título.

Maas MS. Efeito da adição de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) sobre as propriedades mecânicas e liberação de íons após imersão prolongada de compósitos experimentais. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho a memória de minhas avós,
vó **Bê** e vó **Nirce**.*

*“Não existe partida para aqueles que permanecerão
eternamente em nossos corações.”*

Anônimo

AGRADECIMENTOS

*Agradeço imensamente aos meus pais, **Hugo Laerte Maas e Ana Paula Soeiro**, por todo amparo em todas as etapas da minha vida. Obrigada por torcerem e acreditarem em mim, não medindo esforços para me ajudar. Apesar deste mestrado ter significado muitas ausências e abdições, vocês me entenderam e me apoiaram o tempo todo. Obrigada por me incentivarem sempre a buscar minha felicidade e pelo profundo apoio no caminho para encontrá-la. Nunca me esquecerei disso! Devo tudo o que conquistei a vocês! Obrigada pelo companheirismo, pela parceria, pelos conselhos e pela paciência. Só cheguei até aqui porque tinha vocês na retaguarda, devo tudo isso à vocês. Vocês são exemplos pra mim! Meu muito obrigada, de coração!*

*Ao meu irmão, **Marcos Daniel Soeiro Maas**, ou simplesmente, Dinho. Obrigada por ser uma inspiração de força de vontade, auto-disciplina e determinação. Tenho muito orgulho de você! Agradeço também você ter o riso fácil, assim ri de todas minhas piadas. Muito obrigada por toda ajuda! Você é um exemplo!*

*Agradeço a minha tia **Lenara Maas** por sempre me ajudar nas dificuldades e se preocupar comigo. Obrigada pelo companheirismo, pelo suporte e pelo carinho e zelo. Você é uma amiga incrível e me sinto muito feliz com você, tia! Muito obrigada por tudo!*

*Ao meu avô **Paulo**, por sempre me receber com muito carinho e me dar a oportunidade de atendê-lo. Oportunidade de cuidar de quem sempre cuidou de mim!*

*Agradeço a **Isabel Abalos, Mariana Abalos e Isabela Abalos**. Vocês são a maior prova de que família a gente pode escolher também. Serei eternamente grata por todo carinho e cuidado que vocês tem por mim. Saber que posso contar com pessoas tão boas como vocês faz com que eu me sinta muito afortunada. Muito obrigada por tudo!*

*Não posso deixar de agradecer aos meus sogros e minha cunhada, **Maristela Blanco, José Senra e Andreia Blanco**. Obrigada pelo cuidado, carinho e por sempre me acolherem. Me sinto em casa perto de vocês! Muito obrigada!*

*Não poderia de deixar de agradecer aos meus amigos **Maranda Oliveira e Fabricio Zelaya**. Além de toda amizade e companheirismo durante todos esses anos de amizade, vocês me deram a maior benção que alguém poderia receber, **Francisco de Oliveira Zelaya**. É uma felicidade indescritível apadrinhar uma criança tão incrível quanto esse pequeno e ele foi responsável por me apresentar um amor totalmente novo. Eu só tenho a agradecer toda felicidade que vocês me proporcionaram trazendo ele pra minha vida. Obrigada pela amizade incrível e pelo Chicão!*

*Obrigada aos meus amigos que, apesar da distância e das minhas ausências, conseguiram transformar esta fase em algo mais leve. Mesmo só aos finais de semana vocês foram responsáveis por me ajudar em todos os momentos difíceis. Obrigada por ouvir meus desabafos e sempre me colocarem em um estado de espírito melhor. Vocês são incríveis. Obrigada **Alan Abreu, Carol Costa, Deborah Pinheiro, Danielle Sampaio, Flavia Caldas, Gabriela Bahiense, Filipe Paiva, Thayze Siqueira, Roberta Freire, Thiago Almeida, Gabriela Mançano, Camila Ganef, Carolina Ganef, Gabriella Ganef, Michele Pires, Giuliana Pucarelli e Leonardo Ganef**.*

*Às amigas **Livia Natale, Yvette Alania, Marcela Rodrigues, Marina Chiari, Handially Vilela e Mirela Corrêa**. Muito obrigada por toda ajuda e paciência. Nossa rotina não é nada fácil, mas consigo mantê-la mais leve com vocês por perto. Agradeço pelo companheirismo, zelo e amizade de todos os dias. Muito obrigada por tudo!*

*Aos amigos **Ezequias Rodrigues, Sandra Almeida, Mariana Reis, Amanda Cavalcante e Juliana Castro**. Agradeço aos bons momentos vividos e todas as vezes que vocês fizeram eu me sentir bem. Obrigada por ajudarem a transformar meus dias em dias mais leves. Cada palavra amiga e auxílio não serão esquecidos! Muito obrigada, de coração!*

*Agradeço a professora, e também amiga, **Profª. Drª Simone Oliveira**. Agradeço todo o apoio, carinho e as palavras de incentivo sempre. Obrigada por estar presente e por sempre conseguir um tempinho pra escutar meus desabafos sobre este meio. Agradeço por se importar comigo e com todos seus alunos. Você é uma inspiração de professora, profissional e mulher. Nós, seus alunos, temos muita sorte! Obrigada!*

*Agradeço aos colegas da pós graduação: **Alice Natsuko, Ana Carolina Romero, Bruno Lopes, Diego Manarão, Erick de Lima, Flávia Ibuki, Juliana Aguiar, Kelli Monteiro, Mariana Basílio, Pavel Capetillo, Pedro Albuquerque, Ranulfo Miranda, Sabrina Vargas, Stéphanie Favero** e, em especial, a amiga **Talita Souza**. Obrigada pela amizade e por toda ajuda!*

*Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga**. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade e pelas oportunidades oferecidas. Você foi importante para meu desenvolvimento acadêmico e responsável por toda minha experiência neste meio até agora. Obrigada!*

*Agradeço a todos os professores do departamento pela boa convivência: **Prof^a. Dr^a Alyne Simões Gonçalves, Prof. Dr. Carlos Eduardo Francci, Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, Prof. Dr. Igor Studart Medeiros, Prof^a. Dr^a Josete Barbosa Cruz Meira, Prof. Dr. Leonardo Elloy Rodrigues Filho, Prof. Dr. Paulo Eduardo Capel Cardoso, Prof. Dr. Paulo Francisco César, Prof. Dr. Rafael Yague Ballester, Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez e Prof. Dr. Walter Gomes Miranda Junior**. Agradeço também ao **Prof. Dr. Fabrício Ogliari** pela gentileza de enviar o material necessário.*

*Agradeço às secretárias **Rosa Cristina Nogueira e Elidamar Guimarães**, por sempre fazerem o que estava ao alcance para me ajudar. Agradeço por se preocuparem com nós, alunos, e pela disponibilidade para nos auxiliar. Obrigada!*

*Agradeço muito aos técnicos do departamento **Antônio Carlos Lascala e Douglas Nesadal**. A ajuda de vocês é fundamental! Agradeço a paciência e a preocupação. Vocês foram essenciais para a conclusão deste projeto. Muito obrigada!*

*Ao **Departamento de Biomateriais e Biologia Oral**, agradeço toda infraestrutura e a oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Agradeço a **Universidade de São Paulo (USP)** pelo acervo bibliográfico.*

*Agradeço a **Universidade Federal Fluminense (UFF)** pela base.*

*Agradeço a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pelo apoio financeiro.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Não poderia deixar de agradecer especialmente ao meu companheiro **Alexandre J. Blanco Senra**. Obrigada pelo incansável apoio, por todo amor, pelo companheirismo e amizade. Sabíamos que não seria uma etapa nada fácil, mas nossa cumplicidade tornou tudo mais leve e mais uma vez atingimos nossos objetivos, sempre juntos contra todas as adversidades do caminho. Agradeço por acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditava e, por as vezes, estar mais ao meu lado do que eu mesma. Eu tenho muita sorte de poder dividir minha vida com você! Meu melhor amigo, meu companheiro, meu porto seguro. Você faz com que eu queira ser, todos os dias, a melhor versão de mim mesma. Obrigada por isso e por todo o resto!*

“Se você sabe explicar o que sente, não ama, pois o amor foge de todas as explicações possíveis”

Carlos Drummond de Andrade

*" Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu."*

Fernando Pessoa

RESUMO

Maas MS. Efeito da adição de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) sobre as propriedades mecânicas e liberação de íons após imersão prolongada de compósitos experimentais [dissertação] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2017. Versão Corrigida.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades mecânicas e a liberação de íons de compósitos experimentais contendo DCPD após diferentes períodos de imersão. Nanopartículas de DCPD (10 vol%) foram incorporadas em misturas equimolares de BisGMA e TEGDMA ou BisEMA e TEGDMA. Foram adicionadas também 50% de partículas de vidro de bário (VB), 0,5% de canforoquinona e 0,5% de amina terciária. Como controle, materiais contendo apenas partículas de VB (60%) foram avaliados. O grau de conversão (GC) foi determinado através de near-FTIR (n=3). Através do teste de flexão biaxial foram obtidos resultados de resistência à flexão biaxial (RFB) e módulo de elasticidade (E). Fragmentos dos discos testados em flexão foram selecionados para o teste de microdureza Knoop (KHN). Os espécimes (n=10, 12x01mm) foram fraturados após 1, 30, 60 e 90 dias imersos em solução de NaCl (pH=7,0). Os dados de GC foram submetidos ANOVA de dois fatores ("monômero" e "presença de DCPD"). Dados de KHN foram analisados através de ANOVA de três fatores ("monômero", "presença de DCPD" e "tempo de imersão"). Comparações múltiplas foram feitas utilizando-se o teste de Tukey. Dados de RFB, E e liberação de íons foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Dunn (alfa=5% em todos os casos). Independentemente da presença de DCPD, materiais contendo BisGMA apresentaram GC estatisticamente maior do que materiais com BisEMA. A substituição de VB por DCDP provocou redução nos valores iniciais de RFB para BisGMA e BisEMA e em E apenas para BisGMA. Materiais com BisGMA apresentaram valores maiores de E e KHN iniciais. Em geral, compósitos com BisGMA apresentaram maiores reduções nas propriedades mecânicas ao final de 90 dias; assim, compósitos contendo BisEMA apresentaram valores finais mais altos de KHN (independente da presença de DCPD) e RFB (apenas para materiais sem DCPD). Após 90 dias, o E e KHN dos materiais com BisGMA foram menores no compósito com DCPD. Ambos compósitos apresentaram valores crescentes de liberação de cálcio ao longo dos 90 dias, não tendo sido detectadas

diferenças estatisticamente significantes entre monômeros-base nos períodos de 1, 30 e 90 dias. O compósito contendo BisGMA apresentou liberações de fosfato estatisticamente maiores do que o material com BisEMA para todos os períodos de imersão, exceto após um dia. Após 60 dias a liberação de fósforo foi maior para ambos materiais em comparação aos 30 e 90 dias. Apenas para compósito contendo BisGMA foi verificada uma forte correlação linear entre liberação de cálcio e E ($R^2=0,990$). Com base no exposto, pode-se concluir que: 1) o monômero-base utilizado afetou o GC dos materiais avaliados; 2) a presença de DCPD afetou a RFB inicial dos compósitos; 3) apenas os compósitos contendo BisGMA apresentaram reduções nas propriedades mecânicas após 90 dias; 4) ambos compósitos apresentaram diferenças nas concentrações finais de fosfato, mas não nas concentrações de cálcio liberadas; 5) houve correlação apenas entre liberação de cálcio e E de compósitos contendo BisGMA ao longo do período de imersão. Desta forma, todas as hipóteses nulas testadas devem ser rejeitadas.

Palavras-Chave: Fosfato de Cálcio. Propriedades Mecânicas. Liberação de íons. Resina Dental.

ABSTRACT

Maas MS. Effect of the addition of dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) on mechanical properties and ion release after prolonged immersion of experimental composites [dissertation] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2017. Versão Corrigida.

The aim of the study was to evaluate the mechanical properties and ion release of experimental composites containing DCPD after different immersion periods. DCPD nanoparticles (10 vol%) were incorporated into equimolar mixtures of either BisGMA and TEGDMA or BisEMA and TEGDMA. Barium glass particles (50 vol%), 0,5% camphorquinone and 0,5% of ethyl 4-dimethylaminobenzoate were also added. Materials containing only barium glass particles (60 vol%) were considered as control groups. Degree of conversion (DC) was determined by near-FTIR (n=3). Biaxial flexural strength (BFS) and elastic modulus (E) were obtained through the biaxial flexural test. Fragments of the disk-shaped specimens tested in flexure were selected to perform the Knoop microhardness test (KHN). Specimens (n=10, 12x1mm) were tested after 1, 30, 60 and 90 days of immersion in NaCl solution (pH = 7.0). DC results were submitted to two-way ANOVA ("monomer" and "presence of DCPD"). KHN data were analyzed using three-way ANOVA ("monomer", "presence of DCPD" and "immersion period"). Multiple comparisons were made using Tukey test. BFS, E and ion release data were analyzed by Kruskal-Wallis/Dunn test (alpha = 5% in all cases). Regardless of the presence of DCPD, materials containing BisGMA presented statistically higher DC than materials containing BisEMA. Barium glass replacement by DCDP caused a reduction of the initial BFS for BisGMA and BisEMA composites and of initial E only for BisGMA. Materials containing BisGMA presented higher values of initial E and KHN. In general, composites containing BisGMA presented higher reductions in mechanical properties after 90 days. Thus, composites containing BisEMA presented higher final values of KHN (regardless of the presence of DCPD) and BFS (only for materials without DCPD). After 90 days, E and KHN values of materials with BisGMA were lower for the composite containing DCPD. Both composites showed increasing calcium release values during the 90 days, and no statistically significant differences were detected between composites with different

monomers at 1, 30 and 90 days periods. BisGMA-containing composites showed a statistically higher phosphate release than the material with BisEMA in all immersion periods, except for one day period. After 60 days the phosphate release was higher for both materials when compared to 30 and 90 days period. Only for composite containing BisGMA a strong linear correlation between calcium release and E ($R^2 = 0.990$) was verified. Based on the above, it can be concluded that: 1) the base-monomer affected the DC of the evaluated materials; 2) the presence of DCPD affected the initial BFS of the composites; 3) only BisGMA-containing composites showed reductions in mechanical properties after 90 days; 4) both composites showed differences in the final concentrations of phosphate, but not for the calcium concentrations; 5) there was a correlation only between calcium release and E of BisGMA-containing composites throughout the immersion period. Therefore, all null hypotheses tested were rejected.

Keywords: Calcium Phosphate. Mechanical Properties. Ion Release. Dental Resin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Estrutura química dos monômeros	43
Figura 4.2 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando os aglomerados de nanopartículas de DCPD	44
Figura 4.3 - Espécime posicionado no dispositivo “pistão sobre três bolas”	46
Figura 4.4 - Fragmentos fixados aos discos de acrílico.....	47
Figura 4.5 - Fragmento posicionado sob o indentador Knoop.....	48
Figura 5.1 - Médias de grau de conversão dos compósitos testados no estudo. A barra de erro representa desvio padrão de ± 1 . Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre grupos (ANOVA de dois fatores/teste de Tukey, $p < 0,05$)	51
Figura 5.2 - Médias de RFB (MPa) dos compósitos testados. A barra de erro representa ± 1 desvio padrão. Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre períodos de armazenamento para um mesmo material; letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre materiais para um mesmo período de imersão (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$)	53
Figura 5.3 - Médias de módulo flexural (GPa) dos compósitos testados no estudo. A barra de erro representa ± 1 desvio padrão. Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre períodos de armazenamento para um mesmo material; letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre materiais para um mesmo período de imersão (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$)	54

- Figura 5.4 - Médias de microdureza Knoop (KHN) dos compósitos testados no estudo. A barra de erro representa desvio padrão de ± 1 . Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre períodos de armazenamento para um mesmo material; letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre materiais para um mesmo período de imersão (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$)..... 55
- Figura 5.5 - Médias das concentrações de cálcio encontradas no meio de imersão em função do tempo (ppm) para os compósitos contendo DCPD. A barra de erro representa ± 1 desvio padrão. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre períodos de armazenamento para um mesmo material e o asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre materiais em um dado período de observação (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$)..... 57
- Figura 5.6 - Médias das concentrações de fósforo encontradas no meio de imersão em função do tempo (ppm) para os compósitos contendo DCPD. A barra de erro representa ± 1 desvio padrão. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre períodos de armazenamento para um mesmo material e o asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre materiais em um dado período de observação (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$)..... 58
- Figura 5.7 - Análises de regressão entre liberação de cálcio e propriedades mecânicas para os compósitos contendo BisGMA (A: resistência à flexão, B: módulo flexural, C: microdureza Knoop)..... 59
- Figura 5.8 - Análises de regressão entre liberação de hidrogênio fosfato e propriedades mecânicas para os compósitos contendo BisGMA (A: resistência à flexão, B: módulo flexural, C: microdureza Knoop)..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus
µm	Micrômetro
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
BisEMA	Bisfenol A dimetacrilato etoxilado
BisGMA	Metacrilato de glicidila bisfenol A
Ca/P	Razão entre o número de átomos de cálcio e átomos de fósforo
Ca ²⁺	Íons cálcio
CaP	Partículas de fosfato de cálcio
cm	Centímetro
D ₅₀	Valores da mediana da partícula
DCPA	Fosfato di-cálcico anidro
DCPD	Fosfato dicálcico dihidratado
Des/Re	Desmineralização ou Remineralização
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GC	Grau de conversão
GPa	Gigapascal
HA	Hidroxiapatita
HEMA	Hidroxietil metacrilato
HPO ₄ ²⁻	Íons hidrogeno fosfato
J/cm ²	Joule dividido por centímetro quadrado
m ² /g	Metro quadrado dividido por grama
MCPM	Fosfato monocálcico monohidratado
min	Minuto
ml	Mililitro.
mm	Milímetros
mm/min	Milímetros dividido por minuto
mmol	Milimol
mmol/L	Milimol dividido por litro
MPa	Megapascal
N	Newton

n	Número de espécimes (tamanho da amostra)
NACP	Nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo
nm	Nanômetro
OCP	Fosfato octacálcico
pH	Fosfato Potencial de hidrogênio
ppm	Fosfato Partes por milhão
r	Fosfato Raio
RFB	Fosfato Resistencia à flexão biaxial
RPM	rotações por minuto
TEGDMA	Dimetacrilato de trietileno glicol
TTCP	Fosfato tetracálcico
UDMA	Dimetacrilato de uretano
β -TCP	Beta-fosfato tricálcico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	MECANISMOS E APLICABILIDADE DOS FOSFATOS DE CÁLCIO	29
2.2	LIBERAÇÃO DE ÍONS E POTENCIAL REMINERALIZADOR DE COMPÓSITOS CONTENDO FOSFATO DE CÁLCIO	31
2.3	EFEITO DA ADIÇÃO DE PARTÍCULAS DE FOSFATO DE CÁLCIO SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE MATERIAIS RESINOSOS	34
2.4	DEGRADAÇÃO DE COMPÓSITOS RESINOSOS CONTENDO PARTÍCULAS DE FOSFATO DE CÁLCIO	37
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	MANIPULAÇÃO DOS MATERIAIS	43
4.2	GRAU DE CONVERSÃO	44
4.3	TESTE DE FLEXÃO BIAXIAL	45
4.4	MICRODUREZA	47
4.5	LIBERAÇÃO DE ÍONS	48
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS	51
5.1	GRAU DE CONVERSÃO	51
5.2	RESISTÊNCIA À FLEXÃO BIAXIAL E MÓDULO FLEXURAL	52
5.3	MICRODUREZA	54
5.4	LIBERAÇÃO DE ÍONS	56
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de lesões de cárie nas margens de restaurações em compósito devido ao acúmulo de biofilme na interface dente/restauração é uma das principais causas de insucesso deste tipo de procedimento clínico [1-3]. Como tentativa de reduzir a incidência deste tipo de falha, o desenvolvimento de materiais restauradores bioativos contendo ortofosfatos de cálcio (CaP) vem sendo estudado por diferentes grupos de pesquisa [4-9]. Estudos *in vitro* demonstraram que compósitos contendo CaP são capazes de promover o aumento do conteúdo mineral de lesões cariosas iniciais através da liberação de íons cálcio e fosfato [4-6, 10]. A maior disponibilidade de íons proveniente das partículas de CaP complementaria a ação da saliva, que é considerada lenta e com ação limitada às camadas superficiais da lesão [11].

Entretanto, a adição de partículas de CaP em compósitos resinosos possui o inconveniente de provocar uma redução considerável em algumas de suas propriedades mecânicas. Por exemplo, materiais contendo CaP apresentam uma queda entre 32% a 50% na resistência à flexão biaxial (RFB) [12-14] e entre 15% e 18% na tenacidade à fratura [13]. Isto ocorre devido à ausência de interação química entre a matriz resinosa e as partículas de CaP, o que resulta em uma concentração de tensões na interface matriz/partícula favorecendo a propagação de trincas que levam à fratura do material [15, 16]. Assim, a associação entre partículas de reforço e partículas de CaP se faz necessária [9, 15, 17].

Independentemente da presença de partículas de CaP, compósitos resinosos sofrem degradação no ambiente oral, o que se reflete na redução das suas propriedades mecânicas [18-20]. A degradação está intimamente ligada à presença de grupos éster nos monômeros constituintes da matriz resinosa, altamente suscetíveis a mecanismos de oxidação e hidrólise quando expostos a fluidos e enzimas salivares [21]. A degradação hidrolítica da matriz polimérica está relacionada às características dos monômeros presentes em sua composição. O BisEMA (dimetacrilato de glicidila bisfenol A etoxilado) apresenta uma menor sorção de água quando comparado ao BisGMA (dimetacrilato de glicidila bisfenol A), provavelmente devido ao caráter hidrofílico das suas unidades monoméricas. Os grupos hidroxila formam ligações de hidrogênio mais fortes com as moléculas de água do que os

grupos éter do BisEMA [22]. A menor sorção de água apresentada pelo homopolímero de BisEMA reduz sua degradação em água em comparação ao homopolímero de BisGMA [23].

Estudos anteriores verificaram que compósitos experimentais contendo 10% e 20% em volume de nanopartículas de CaP apresentaram reduções mais severas na RFB e na tenacidade à fratura em comparação aos respectivos controles sem CaP após 28 dias de armazenamento em água [13, 24]. Por outro lado, um estudo avaliando o efeito da imersão de compósitos experimentais por até dois anos apresentou valores maiores de resistência à flexão para compósitos com 10% e 15% em peso de fosfato de cálcio amorfo, ACP (65% e 60% em peso de partículas de reforço, respectivamente. ACP: 112 nm) quando comparados ao compósito controle (contendo somente 75% em peso de partículas de reforço). Entre o material contendo 20% de ACP e 50% de partículas de reforço e o controle não foram encontradas diferenças nos valores de resistência à flexão [14].

A liberação de íons a partir de matrizes resinosas depende de uma série de fatores, dentre eles o conteúdo e o tamanho das partículas de CaP [25], o pH do meio de imersão [2, 26, 27] e o grau de hidrofilia da matriz orgânica na qual as partículas são incorporadas [5]. Estudos de liberação de íons avaliaram períodos de imersão entre 28 e 56 dias [2, 9, 13, 26-28]. De uma maneira geral, observa-se uma maior liberação na primeira semana de experimento [13, 17, 26, 29]. Contudo, a duração desta liberação parece estar correlacionada com a composição dos materiais utilizados. Por exemplo um compósito contendo 10% em volume de DCPD (fosfato dicálcico dihidratado) e 50% de partículas de reforço liberou 7 ppm de cálcio e 2 ppm de fosfato de após uma semana de imersão. Após 14 dias a liberação de cálcio diminuiu cerca de 71% e de fosfato 50% em relação a primeira semana. A liberação acumulada após 28 dias foi de 28 ppm de cálcio e 6 ppm de fósforo [13]. Um material contendo 40% em peso de ACP sem partículas de reforço apresentou liberação de 20 ppm para Ca^{2+} e de 10 ppm para PO_4^{3-} após 7 dias e a liberação se manteve quase contínua durante as quatro semanas de experimento. Ao final dos 28 dias de imersão apresentou resultados acumulados de 32 ppm de cálcio e 20 ppm de fosfato [9]. Compósitos contendo 65% em peso de fosfato dicálcico anidro (DCPA, 112 nm) apresentaram liberações de cálcio de 34 ppm de cálcio e 108 ppm de fósforo após 56 dias de liberações acumuladas [29]. Compósitos contendo CaP que utilizaram como monômero-base o BisEMA liberaram concentrações iônicas três vezes maiores

quando comparados a materiais contendo BisGMA ou UDMA (dimetacrilato de uretano), o que parece um contra-senso considerando-se a menor hidrofilia daquele monômero. Segundo os autores, isto ocorreu devido à menor densidade das ligações cruzadas do copolímero contendo BisEMA, o que facilitaria o trânsito de fluidos no interior do compósito [5].

O desenvolvimento de compósitos contendo nanopartículas de CaP requer que se conheça o seu desempenho a longo prazo, principalmente no que se refere ao efeito da imersão prolongada em água sobre suas propriedades mecânicas. Além disso, frente ao reduzido número de estudos avaliando os efeitos da imersão prolongada bem como à controvérsia existente entre eles, a influência da composição da matriz polimérica sobre o comportamento mecânico e liberação de íons destes materiais precisa ser melhor compreendida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MECANISMOS E APLICABILIDADE DOS FOSFATOS DE CÁLCIO

Ortofosfatos de cálcio (CaP) possuem a capacidades de liberar íons cálcio e fosfato com a finalidade de remineralizar ossos e dentes, por este motivo vem sendo amplamente estudados na área biomédica e odontológica [4, 7, 30, 31], e, além disto, estes materiais demonstram grande biocompatibilidade com os tecidos vivos [32, 33]. Com o objetivo de entender este processo de remineralização destes materiais mais a fundo, a cristalização, dissolução, estabilidade de fase, bem como os mecanismos físico-químicos compreendidos nestas etapas são amplamente investigados [34]. Entretanto, nem todos os CaP são capazes de serem utilizados na área médica/odontológica, uma vez que fosfato de cálcio extremamente solúveis apresentariam tempo de ação muito limitado, enquanto que aqueles de solubilidade muito baixa não forneceriam íons cálcio e fosfato em concentrações suficientes para remineralização [35].

Existem diversos tipos de ortofosfatos de cálcio que são estudados na área biomédica e odontológica, entretanto, o DCPD (fosfato dicálcico dihidratado), ACP (fosfato de cálcio amorfo), β -TCP (β -fosfato tricálcico) e OCP (fosfato octacálcico), em virtude de serem classificados como precursores de hidroxiapatita (HA), despertam maior interesse. A temperatura, molaridade cálcio/fosfato e pH da solução têm influência direta na precipitação e transformação dos ortofosfatos de cálcio. Por exemplo, quanto menor a proporção entre Ca e P, mais solúvel é o composto em meio aquoso [36]. Compostos com Ca:P menor que 1,0 não são vantajosos por serem muito solúveis [32].

Cada uma destas fases tem estrutura, índice de refração e solubilidade diferentes [37]. A dificuldade com a aplicação do material cristalino (DCPD, β -TCP e OCP), na cavidade oral para promover a remineralização do esmalte é a baixa solubilidade das fases de fosfato de cálcio, de modo que os íons cálcio e fosfato não se encontram disponíveis para remineralização. Estas fases de fosfato de cálcio cristalino devem ser liberadas do material em contato com a saliva e depois se dissolver nesse fluído para liberar íons capazes de se difundir para a lesão

subsuperficial do esmalte. A dissolução da fase de fosfato de cálcio na saliva requer que esta seja subsaturada em relação àquela fase cristalina e, de modo geral, no intervalo de pH normal da saliva, estas fases de fosfato de cálcio cristalino são pouco solúveis [38].

Na estrutura da HA pode ocorrer perda de íons e nestes “vazios” ocorrem trocas de íons que são capazes de alterar a estrutura cristalina, bem como a forma do cristal, a estabilidade térmica e a solubilidade. Em geral, estes espaços são deixados por íons cálcio, porém também podem acontecer por íons fosfato ou hidroxila [32]. A HA é considerada a fase com menor solubilidade entre os CaP, sendo capaz de se precipitar em pH neutro ou básico permanecendo estável em água e, em virtude da sua simetria química com tecidos duros, é extensivamente empregada na área biomédica [32, 34].

Ortofosfatos de cálcio são empregados em uma pluralidade de aplicações, tanto em biomedicina quanto na área de odontologia. Em biomedicina são encontrados em enxertos bioreabsorvíveis [39, 40], vetores não-virais para terapia genética [33], revestimentos para implantes intraósseos [41], veículo de entrega de drogas [30, 33], marcadores fluorescentes [33, 42], silenciamento genético [33] e na formulação de cimentos ósseo [31].

Na odontologia, é utilizado como recobrimento de implantes osseointegrados [43], tratamento de fraturas na cirurgia oral e bucomaxilofacial [44]. Podem ser encontrados também em uma gama variada de produtos, como géis mineralizadores [45], dentifrícios [46], adesivos ortodônticos [47], clareadores dentais [48], selantes de fóssulas e fissuras [49] e gomas de mascar [50]. Estes compostos, atualmente, também vêm sendo incorporados a compósitos resinosos com objetivo de diminuir o risco de desenvolvimento de lesões de cárie nas margens de restaurações devido ao acúmulo de biofilme na interface dente/restauração [13].

2.2 LIBERAÇÃO DE ÍONS E POTENCIAL REMINERALIZADOR DE COMPÓSITOS CONTENDO FOSFATO DE CÁLCIO

Como foi mencionado anteriormente, a liberação de íons a partir de matrizes resinosas depende de diversas condições. O conteúdo de partículas bioativas no material é uma delas. O aumento na proporção de partículas aumenta a fonte de íons, permitindo uma maior interface com a matriz orgânica, ocasionando em uma maior saída de íons para o meio [5, 27]. A liberação de íons apresenta uma relação exponencial com conteúdo de partículas no material [28] e concentrações significativamente maiores de Ca^{2+} e PO_4^{3-} foram observadas em materiais contendo partir de 37,5% em peso de partículas [12].

O tamanho das partículas está inversamente relacionado com a liberação de íons, dado que partículas de menor tamanho possuem uma área de superfície maior e, dessa maneira, uma maior interface com a matriz resinsosa. A área superficial da partícula parece ser um fator mais relevante para a liberação de íons do que a fase de ortofosfato de cálcio utilizada no material [7]. Portanto, partículas nanométricas são preferidas em relação às partículas micrométricas, uma vez que liberam altas concentrações de íons mesmo em baixas concentrações [25]. Um compósito contendo 65% em peso de partículas nanométricas de DCPA, fosfato dicálcico anidro (com tamanho de 112 nm e área superficial de $18,6 \text{ m}^2/\text{g}$) liberou cerca de 20% mais cálcio e até 70% mais fosfato quando comparado a compósitos contendo partículas micrométricas (com tamanho de $12 \text{ }\mu\text{m}$ e área superficial de $0,17 \text{ m}^2/\text{g}$) após 56 dias de imersão em solução salina [29].

O pH do meio de imersão é uma condição importante relacionada à liberação de íons, uma vez que quanto mais ácido é o meio, maior é a difusão de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Esse aumento da liberação decorre da maior erosão das partículas em pH ácido [2, 26, 27]. Por apresentarem a capacidade de modular a liberação de íons de acordo com as condições do ambiente, compósitos contendo ortofosfatos de cálcio são denominados como “materiais inteligentes”. Em $\text{pH}=4$ as partículas são mais facilmente dissociadas e, em vista disto, a liberação de íons é cerca de cinco a dez vezes maior quando comparada ao observado em $\text{pH}=7$ [26, 27].

Finalmente, a liberação de íons também é influenciada pelo grau de hidrofília da matriz orgânica na qual as partículas são incorporadas. Quanto menor densidade

de ligações cruzadas do copolímero formado, maior facilidade de trânsito de fluidos no interior do compósito e a difusão de íons para o meio externo. Compósitos contendo 40% em peso de partículas ACP (fosfato de cálcio amorfo) que utilizaram um copolímero BisEMA/HEMA (hidroxietil metacrilato) liberaram concentrações três vezes maiores quando comparados a materiais contendo BisGMA ou UDMA como monômeros-base [5].

Idealmente, do ponto de vista clínico é desejável que o material seja capaz de liberar íons de forma sustentada por longos períodos a fim de manter o ambiente constantemente supersaturado em relação ao dente. Entretanto, como era de se esperar, a liberação de íons diminui ao longo do tempo e a relação entre os fatores mencionados irá definir a duração desta liberação. De modo geral, estudos reportam concentrações iônicas liberadas por períodos de acompanhamento que variam entre 28 e 56 dias [2, 9, 13, 26-28]. Em condições de pH neutro, estes estudos relatam uma maior liberação nos primeiros sete dias, independentemente da concentração de partículas de CaP no compósito ou da presença de partículas de reforço [13, 17, 26, 29]. Entretanto, estes experimentos divergem entre si quanto à duração desta liberação, o que parece estar relacionada com a composição dos materiais avaliados. Em materiais contendo 65% de DCPA a liberação iônica cessou após duas semanas [29]. Contudo, para materiais com 37,5% de TTCP (fosfato tetracálcico, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) e 37,5% de whiskers de nitreto de silício ou 75% de TTCP apenas, praticamente nenhuma liberação foi observada após 7 dias [26]. Compósitos contendo 40% em peso de ACP e 10% de vidros de reforço apresentaram liberação quase constante ao longo de 28 dias [9]. Compósitos contendo 10% ou 20% de DCPD em pH 7, apresentaram liberação de íons estatisticamente inferior após 14 dias em relação a sete dias; no entanto, aos 21 e 28 dias as concentrações mantiveram-se estatisticamente semelhantes às observadas após duas semanas [13]. Em pH ácido (pH=4), a liberação de íons é mais intensa e prolongada, não se estabilizando mesmo após 28 dias [26]. Para um compósito contendo 20% de ACP e 50% de vidros de reforço, a liberação de íons foi esgotada após 70 dias em pH 4. Neste estudo, os autores demonstraram que o compósito foi passível de recarga quando imerso três vezes ao dia em solução de CaCl_2 por um minuto, durante três dias [51].

O potencial remineralizador de materiais contendo partículas CaP foi demonstrado em diversos estudos *in vitro* e *in situ*. Estes estudos se diferenciam pelas formulações do material utilizado e pelos métodos experimentais empregados, tais

como: a solução de imersão, o tempo de armazenamento, o pH, regime estático/ciclagem de pH e volume de partículas bioativas. Dentre os experimentos realizados *in vitro* um compósito com 40% em peso de ACP aplicado sobre lesões artificiais em esmalte ao longo de 28 dias, para modelo estático (quatro semanas em pH 7 a 37°C), ou 14 dias submetido a ciclagem de desmineralização/remineralização (11,5 horas em pH 7 seguido por 30 min em pH 4 durante duas semanas a 37°C). Com ambos os modelos foi observada recuperação do conteúdo mineral da lesão entre 38% e 71%. [52]. Outro estudo avaliou cimentos resinosos experimentais contendo 73% a 79% em peso de uma mistura de partículas de DCPA (1,1 µm) e TTCP (16 µm) e também contendo 1,5 % de hexafluorosilicato de sódio foram posicionados justaposto com a dentina desmineralizada e foram responsáveis por estimular um aumento mineral entre 38% e 47% após 35 dias em saliva artificial [6].

Quando comparado a compósitos com flúor em sua formulação, compósitos contendo CaP tendem a obter melhores resultados, independentemente do tamanho das partículas utilizadas. Em lesões de esmalte após 30 dias de ciclagem DES/RE, um material contendo 40% em peso de ACP modificado por zircônia (mediana: 55 µm) disperso em uma matriz orgânica relativamente hidrofílica, com BisEMA, TEGDMA (dimetacrilato de trietilenoglicol) e HEMA, resultou em um ganho mineral de 14%, consideravelmente maior que os 4% do material com flúor [10]. Em condições de ciclagem semelhantes, um material com 40% em peso de nanopartículas de ACP (116 nm) e 20% em peso de partículas de reforço (1,4 µm) possibilitou uma remineralização de 22%, enquanto para o material comercial com flúor a recuperação mineral foi de apenas 6% [4].

Estes resultados foram confirmados em um estudo *in situ* no qual a utilização de um compósito contendo 40% em peso de nanopartículas de ACP (NACP, 116 nm) e 20% em peso de vidro de bário (1,4 µm) em uma matriz contendo BisGMA e TEGDMA (considerada relativamente menos hidrofílica) usado em restaurações feitas em fragmentos de esmalte inibiu o desenvolvimento de lesões de cárie, se mostrando capaz de inibir a desmineralização da estrutura dentária em 59% após duas semanas. [2]. A adição de partículas de ortofosfato de cálcio em compósitos resinosos, além de dispensar íons para remineralização, também inibiram o crescimento de biofilme e a produção de ácidos em níveis semelhantes ao dos materiais com flúor [53].

2.3 EFEITO DA ADIÇÃO DE PARTÍCULAS DE FOSFATO DE CÁLCIO SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE MATERIAIS RESINOSOS

A incorporação de partículas de ortofosfatos de cálcio em compósitos resinosos possui o inconveniente de provocar uma redução considerável em algumas de suas propriedades mecânicas, tais como a tenacidade à fratura e a resistência à fratura [13, 15]. Compósitos contendo 40% em peso de partículas de ACP demonstram uma diminuição na RFB de aproximadamente 50% quando comparados a um compósito controle sem carga [12]. Materiais experimentais contendo DCPD (20% em volume, 8 μm) e partículas de vidro (40% em volume, 0,5 μm), apesar de apresentarem um acréscimo de 12% na tenacidade à fratura, demonstraram também uma diminuição de 28% na resistência à flexão quando comparados ao material controle sem partículas bioativas (60% em volume de vidro de bário) após 24 horas e 37% após quatro semanas [13]. Materiais contendo 70% em peso de partículas de TTCP (tamanho médio de 1,4 μm) demonstraram uma diminuição de 47% na RFB em relação à resina sem carga, embora tenham apresentado um aumento de 77% no módulo de elasticidade [15]. Compósitos contendo 40% em peso de ACP apresentaram resistência à flexão 26% menor do que um ionômero de vidro modificado por resina (Fuji II LC capsule; FII; GC, Tokyo, Japan) [9]. A menor resistência à fratura se deve à ausência de interação química entre a matriz resinosa e as partículas de ortofosfato de cálcio, o que resulta em uma concentração de tensões na interface matriz/partícula favorecendo a propagação de trincas que levam à fratura do material [15, 26] e pela baixa resistência coesiva dos aglomerados de fosfato de cálcio [13].

Uma vez que partículas de ortofosfato de cálcio não possuem função de reforço, diversos estudos propuseram formulações contendo partículas de vidro silanizadas associadas às partículas de CaP. A associação das partículas de reforço com o CaP apresentou um aumento na RFB quando comparado com compósitos controle sem partículas de reforço, e, além disto, não afetou o potencial remineralizador do compósito [9, 15, 17]. Compósitos confeccionados com 40% em peso de TTCP (tamanho médio 1,4 μm) e até 30% de partículas de reforço apresentaram aumento na RFB quando comparados ao material contendo apenas TTCP (99 MPa e 54 MPa, respectivamente) [15]. Após quatro semanas de imersão

em meio aquoso em pH=7,0, a substituição de partículas de reforço por 20% de DCPD diminuiu a RFB do material entre 32% e 48% e a tenacidade à fratura entre 15% e 18%, para conteúdos de carga entre 40% e 60% em volume [13]. Para compósitos contendo ACP, a resistência à flexão tende a diminuir significativamente com o aumento do nível de ACP no compósito. Materiais contendo 50% de partículas de carga e 20% de NACP apresentaram uma resistência à flexão 40% menor quando comparados a materiais com 75% de partículas de carga sem NACP [14]. Foi analisada a resistência à flexão biaxial de materiais contendo 40% em peso de diversos tipos de ACP e a matriz orgânica composta por BisGMA, TEGDMA e, em alguns grupos, HEMA. Materiais contendo ACP modificado por partículas de reforço (sílica ou zircônia) demonstraram resultados 25% a 33% maiores quando comparados ao material contendo somente ACP não-estabilizado. Isto se deve a alteração da dureza e da forma das partículas, o que resulta em uma maior interação entre o ACP modificado e o polímero [12].

A adição de ortofosfato de cálcio em materiais quimicamente ativados reforçados com whiskers de carbetto de silício impregnados com nanopartículas de sílica também promoveu uma melhora na RFB. Compósitos contendo 40% em peso de whiskers e 20% de DCPA (tamanho médio: 50 nm) adicionados a uma matriz orgânica de BisGMA, TEGDMA e HEMA mostraram um aumento de 22% e 45% na resistência à flexão em três pontos quando comparados ao material com 20% de whiskers e 40% de DCPA e ao material híbrido comercial (TPH, Caulk/Dentsply, Milford, DE, USA), respectivamente [54]. Partículas de sílicas fundidas a whiskers de carbetto também foram avaliadas em compósitos contendo MCPM (fosfato monocálcico monohidratado, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Um compósito cuja matriz orgânica era constituída por BisGMA/TEGDMA/HEMA e a porção inorgânica formada por 70% em peso de MCPM (tamanho médio: 152 nm) e whiskers de carbetto de silício (14 μm) com sílica fundida (40 nm) apresentou módulo de elasticidade e resistência à flexão estatisticamente semelhantes a um compósito comercial microhíbrido (TPH, Caulk/Dentsply, Milford, DE) [25].

Outra possibilidade para tentar solucionar o problema da redução das propriedades mecânicas nos materiais contendo ortofosfato de cálcio é a funcionalização da superfície das partículas CaP, com objetivo de melhorar a interação química entre a matriz e as partículas [55-58]. A resistência à fratura apresentou, de fato, uma melhora em comparação aos materiais com partículas DCPA

não silanizadas em compósitos com 65% em massa de porção inorgânica (112 nm). Entretanto, observou-se que a silanização das partículas CaP resultou em redução da liberação de íons do material. Isto ocorre em virtude do caráter hidrofóbico do silano, o que prejudica o acesso da água com a partícula bioativa [29].

Como alternativa ao caráter hidrofóbico do silano, a funcionalização das partículas com monômeros mais hidrofílicos como ácido acrílico e metacrílico foi avaliada. Estes ácidos possuem em sua composição grupos hidroxila e vinila, onde o primeiro apresenta afinidade por íons cálcio e o segundo tem a capacidade de copolimerização com a matriz orgânica. A utilização destes monômeros como agentes de ligação entre partículas de hidroxiapatita (35% em volume) adicionadas a resinas de dimetacrilato resultou em valores 75% maiores para resistência à flexão quando comparados a materiais contendo HA não funcionalizada. Entretanto, infelizmente, a liberação de íons cálcio e fosfato não foi avaliada neste estudo [56].

Recentemente, a síntese de nanopartículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA foi descrita na literatura. Um aumento de 32% na resistência à flexão foi alcançada com a adição de 20% em volume de DCPD em uma matriz orgânica de BisGMA/TEGDMA, quando comparada ao material controle sem partículas funcionalizadas [59].

A utilização de nanopartículas de DCPD funcionalizadas com TEGDMA (tamanho do aglomerado: 20 μm) melhorou significativamente a resistência à fratura dos compósitos contendo CaP em relação ao uso de DCPD não funcionalizado. Após 24 horas de imersão em água, a funcionalização de partículas com 14% ou 22% de TEGDMA melhorou a RFB do compósito em comparação com DCPD não funcionalizado (17 μm), em ambos os níveis de DCPD testados (10% e 20% em volume). Após 28 dias, a RFB de materiais contendo 10% de DCPD funcionalizado e 50 % de partículas de reforço foi estatisticamente semelhante ao controle contendo 60 % vidro de bário (0,5 μm). Entre os compósitos contendo 10% de DCPD, a funcionalização das partículas com 14% de TEGDMA não comprometeu a liberação de íons. Por outro lado, a adição de partículas de ortofosfato de cálcio não silanizadas diminuiu a RFB em 41% (para materiais com 10% de DCPD) e 71% (para materiais com 20% de DCPD) quando comparado aos respectivos controles. Já a liberação de íons cálcio reduz cerca de 25% e íons fosfato cerca de 56% quando comparado o material contendo 10% de DCPD com o de 20% de partículas bioativas. Em virtude disto, a relação entre partículas de CaP e partículas de reforço é de extrema

importância para encontrar o equilíbrio entre propriedades mecânicas e uma liberação de íons efetiva para promover a remineralização [24].

2.4 DEGRADAÇÃO DE COMPÓSITOS RESINOSOS CONTENDO PARTÍCULAS DE FOSFATO DE CÁLCIO

A porção orgânica presente na formulação de compósitos resinosos é responsável pela degradação do material quando em contato com enzimas salivares e demais fluidos. Monômeros presentes na matriz resinosa possuem grupos éster em sua composição, estes, por sua vez, são altamente suscetíveis à oxidação e hidrólise no ambiente oral, o que, conseqüentemente, se reflete na redução das propriedades mecânicas e longevidade limitada da restauração [21].

A sorção de água dos compósitos dentários é altamente dependente das características físico-químicas dos seus componentes, tais como a estrutura tridimensional da rede polimérica formada, o volume livre dentro da estrutura [60] e o caráter hidrofílico e a solubilidade da rede polimérica [23]. Um estudo avaliando a sorção de água, a solubilidade, módulo de elasticidade e resistência à flexão de homopolímeros de dimetacrilatos verificou que o BisGMA apresentou maior valor de sorção de água ($51,2 \mu\text{m}/\text{mm}^3$) e solubilidade ($9,5 \mu\text{m}/\text{mm}^3$) quando comparado ao BisEMA ($21,3 \mu\text{m}/\text{mm}^3$ e $2,1 \mu\text{m}/\text{mm}^3$, respectivamente) [23]. Esta diferença entre os monômeros é explicada pelo caráter mais hidrofílico da molécula do BisGMA devido às interações mais fortes da água com grupos hidroxila presentes na molécula [61]. Além disso, o BisGMA apresenta grau de conversão menor do que o BisEMA, o que favorece a sorção [62]. A comparação entre valores de sorção de água de compósitos experimentais contendo 60% em peso de partículas de reforço e 40% de fase orgânica constituída por misturas de TEGDMA com BisGMA, BisEMA ou UDMA também demonstrou valores muito menores para o material à base de BisEMA (0,4%) em relação ao BisGMA e ao UDMA (1,2%) [19]. Estudos utilizando compósitos comerciais confirmam a tendência de materiais contendo BisEMA de apresentarem valores menores de sorção e solubilidade após imersão prolongada em água [63].

Alguns estudos sugerem que materiais contendo partículas de ortofosfato de cálcio apresentam uma maior redução nas suas propriedades mecânicas após

períodos prolongados de imersão do que aquelas apresentadas por materiais sem partículas bioativas, provavelmente devido à uma maior sorção de água ocasionada pela passagem de fluidos ao longo da interface CaP/matriz. Compósitos contendo 25% ou 40% em massa de ACP e matriz orgânica à base de BisGMA e outros diferentes monômeros (TEGDMA, PHEMA, GDMA ou HEMA) foram imersos durante 30 dias em solução de cloreto de sódio. Após imersão, compósitos bioativos demonstraram valores menores de RFB quando comparado aos respectivos controles. Materiais contendo 25% de ACP apresentaram reduções de 56% a 67%, enquanto nos compósitos com 40% de CaP esta queda na RFB chegou somente até 60% [64]. Um outro estudo, corroborando com estes resultados, demonstrou que a incorporação de TTCP (20%, 40%, 60% e 70% em massa) diminuiu significativamente a resistência à flexão (variando de cerca de 50-60 MPa), em comparação com 95 MPa do material sem partículas bioativas após quatro semanas de armazenamento. Demonstrando uma redução na resistência à flexão de até 47% quando comparados materiais bioativos aos seus respectivos controles [15]. Em outro estudo, compósitos experimentais contendo nanopartículas de DCPD (10% e 20% em volume) e partículas de vidros de bário apresentaram reduções mais severas na RFB e na tenacidade à fratura em comparação aos controles sem DCPD [13].

Contudo, há na literatura estudos que demonstram resultados contrários aos apresentados. Materiais contendo misturas equimolares de BisGMA e TEGDMA e 60% em volume de partículas de carga, sendo 40-60% de reforço e 0-20% de DCPD verificou que compósitos bioativos tiveram uma diminuição menos acentuada na RFB quando comparado aos materiais controle. As reduções na propriedade mecânica para 10% e 20% de DCPD foram de 32% e 21%, respectivamente, enquanto no controle essa queda na RFB chegou a 39%. Portanto, apesar de apresentarem um valor final mais alto, o compósito sem partículas CaP apresentou uma degradação mais severa quando comparado a materiais contendo ortofosfatos de cálcio [24].

Em outro estudo, um material contendo 75% em peso de partículas de reforço apresentou diminuição de 56% na resistência à flexão após dois anos em água, enquanto o material com 20% de ACP e 50% de vidros de reforço apresentou redução de 46%; entretanto, a quantidade de desgaste registrada para o compósito com 20% ACP/50% de partículas de reforço foi 60% maior em comparação a um compósito microparticulado comercial [14].

Frente à importância de se obter uma liberação de íons sustentada ao longo do tempo bem como ao número limitado de estudos que avaliaram a liberação de íons e a redução nas propriedades mecânicas de compósitos contendo ortofosfatos de cálcio após períodos de imersão prolongados, é importante que a possível relação entre estas duas características seja investigada.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de conversão, as propriedades mecânicas (resistência à flexão biaxial, módulo flexural e microdureza) e a liberação de íons de compósitos experimentais contendo DCPD após diferentes períodos de imersão. As hipóteses nulas testadas foram: 1) o grau de conversão e as propriedades mecânicas iniciais não são afetados pela presença de DCPD ou pelo monômero-base, 2) as propriedades mecânicas dos compósitos não são afetadas pelo período de imersão, 3) os valores acumulados das concentrações iônicas liberadas ao final de 90 dias não são afetados pela composição da matriz resinosa e 4) não existe correlação entre liberação de íons e variações nas propriedades mecânicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MANIPULAÇÃO DOS MATERIAIS

Foram preparadas duas matrizes poliméricas, uma delas contendo 1:1 em mols de BisGMA (dimetacrilato de glicidila bisfenol A, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e TEGDMA (dimetacrilato de trietilen glicol, Sigma-Aldrich) e a outra contendo 1:1 em mols de BisEMA(4) (dimetacrilato de glicidila bisfenol A etoxilado, Esstech, Essington, PA, EUA) e TEGDMA (figura 4.1). O sistema fotoiniciador foi constituído por 0,5% de canforoquinona (Sigma-Aldrich) e 0,5% de amina terciária (4-dimetilaminabenzoato) de etila, Sigma- Aldrich). Para os materiais controle, a fase inorgânica era constituída por partículas silanizadas de vidros de bário (D_{50} : 0,5 μm) ocupando uma fração volumétrica de 60%. Nos materiais bioativos, a fase inorgânica continha 50 vol% de vidros de bário e 10 vol% de DCPD (D_{50} : 0,67 μm , Labsynth, Diadema, SP, Brasil). As imagens das partículas observadas em microscopia eletrônica de varredura são apresentadas na Figura 4.2. Os compósitos foram misturados mecanicamente a vácuo, sob 2500 rpm durante 15 segundos (Speedmixer, FlacktecInc, Landrum, SC, EUA) e mantidos sob refrigeração até 1 hora antes da sua utilização.

Figura 4.1 – Estrutura química dos monômeros.

Fonte: Adaptado de Gajewski et al.[23]

Figura 4.2 - Imagem da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando os aglomerados de nanopartículas de DCPD

4.2 GRAU DE CONVERSÃO

O grau de conversão (GC) dos materiais resinosos foi determinado através de espectroscopia no infra-vermelho próximo. Foram confeccionados corpos de prova ($n=3$) utilizando-se uma matriz de silicone com 7 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. O material não-polimerizado foi inserido na matriz e pressionado entre duas lâminas de vidro, as quais foram fixadas com uma fita adesiva para não permitir seu deslocamento. O conjunto foi levado para um espectrômetro FTIR (Vertex 70, Bruker Optik, Alemanha) e posicionado perpendicularmente ao feixe de infra-vermelho, de modo que este passasse pelo centro do corpo de prova. O espectro do material não-polimerizado foi obtido pela co-adição de 32 scans, com resolução de 4 cm^{-1} . Logo após, o material foi fotopolimerizado (Bluephase N, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) através da lâmina de vidro, recebendo irradiância de 12 J/cm^2 e armazenado em estufa a 37°C por 24 horas. Decorrido este intervalo, foi obtido um novo espectro seguindo os mesmos parâmetros do anterior. O grau de conversão foi calculado pela razão entre as áreas da banda de absorção localizada em 6165 cm^{-1} do material polimerizado e não polimerizado.

4.3 TESTE DE FLEXÃO BIAxIAL

Com o auxílio de uma matriz de aço, foram preparados discos com 12 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Após a inserção na matriz, a superfície do material foi recoberta por uma tira de poliéster e cada quadrante foi fotopolimerizado por 20 segundos (Bluephase N, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), recebendo 24 J/cm². Após serem removidos da matriz, os corpos de prova foram imersos individualmente em 38 ml de solução de cloreto de sódio 133 mmol/L, tamponada em pH=7,0 utilizando-se 50 mmol/L de solução HEPES [16] e mantidos a 37°C por 24 horas, 30, 60 ou 90 dias (n=8-12). As soluções foram trocadas quinzenalmente a fim de evitar a proliferação de micro-organismos, bem como para prevenir a saturação do meio de imersão com íons cálcio e fosfato, o que poderia interferir na sua liberação. Apenas para os compósitos contendo DCPD, antes de cada troca de solução, os tubos foram colocados em ultrassom durante cinco minutos com o objetivo de remover eventuais depósitos de fosfato de cálcio que teriam se formado na superfície do corpo de prova. Apenas os meios de imersão correspondentes aos compósitos bioativos foram congelados. Para os compósitos controle, as soluções foram descartadas.

Transcorrido o período de armazenamento, os corpos de prova foram fraturados em um dispositivo do tipo “pistão sobre três bolas” em uma máquina universal de ensaios (modelo 5565, Instron Corp, Canton, MA, EUA). As amostras foram posicionadas concêntricamente sobre três esferas de aço com diâmetro de 2,5 mm com a face irradiada correspondendo à superfície sob compressão. A carga foi aplicada no centro do corpo de prova através de um pistão de ponta plana com 1,2 mm de diâmetro a uma velocidade de 0,5 mm/min (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Espécime posicionado no dispositivo “pistão sobre três bolas”

Os valores de resistência à flexão biaxial foram calculados usando as seguintes fórmulas:

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

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

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

Onde, σ_{bi} é o valor de resistência à flexão (em MPa), P é a carga de fratura (em N), h é a altura do corpo de prova (em mm), ν é o coeficiente de Poisson do compósito ($\nu = 0,24$) [65], r_1 é o raio de apoio para as esferas de aço (5 mm), r_2 é o raio do pistão usado para a aplicação da carga (0,6 mm) e r_3 é o raio do corpo de prova (em mm).

Os valores de E foram calculados usando a equação:

$$E = \frac{\beta P a^2}{\omega h^3} \times 0,001$$

Onde E é o módulo de elasticidade (em GPa), 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), w é a deflexão no centro do corpo de prova correspondente à carga P e h é a espessura do disco (em mm).

4.4 MICRODUREZA

Imediatamente após o teste de flexão, fragmentos dos corpos de prova foram selecionados para o teste de microdureza Knoop. Para isso, os fragmentos foram fixados em discos de acrílico, com o auxílio de cera para escultura, com a superfície não-irradiada voltada para cima (Figura 4.4)

Figura 4.4 - Fragmentos fixados aos discos de acrílico

Em seguida, cada fragmento recebeu cinco endentações distribuídas na superfície não-irradiada, utilizando-se uma carga de 100 g por 10 segundos (HMV-2T, Shimadzu Corporation, Kioto, Japão) (Figura 4.5) [66]. A média dos cinco valores foi utilizada como valor de microdureza para aquele corpo de prova.

Figura 4.5 - Fragmento posicionado sob o indentador Knoop

4.5 LIBERAÇÃO DE ÍONS

As soluções em que os corpos de prova dos compósitos contendo DCPD ficaram imersos foram analisadas para determinação das concentrações de Ca^{2+} e HPO_4^{2-} através de espectrofotometria (DU 800 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Brea, CA - USA). A concentração de fósforo na amostra foi determinada através do método de Fiske e Subbarow modificado [67]. Esta técnica consiste na reação do molibdato de amônio com o fósforo presente na solução, formando ácido fosfomolibdico. Em seguida, o ácido fosfomolibdico é reduzido pelo ácido ascórbico, desenvolvendo uma coloração azulada, cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato presente na solução. O procedimento iniciou-se com a coleta de 1 mL da solução de armazenamento em um tubo de ensaio, seguida pela adição de 1,8 mL de água deionizada. Imediatamente, adicionou-se 1,5 mL de ácido tricloroacético 1,2 M e 0,5 mL de molibdato de amônio 2,5% em ácido sulfúrico 10 N. Uma solução de ácido ascórbico 1% (preparada somente no momento do uso dissolvendo 0,1 g para 10 mL de água destilada) foi adicionada (0,2 mL) à solução inicial. A solução obtida foi mantida em repouso por 30 minutos e então submetida à leitura no espectrofotômetro a 720 nm. A quantificação de cálcio foi feita através do método colorimétrico de Patrick *et al.* [68, 69]. Esta técnica consiste na adição de ácido cloranílico ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_2\text{O}_4$), o qual é responsável pela precipitação do íon cálcio,

resultando em cloranilato de cálcio. Sucessivamente a embebição com álcool isopropílico, é então adicionado solução de ácido etilenodiamino tetra-acético 5% (EDTA). Nesta etapa final o líquido adquire uma coloração rósea conforme a concentração de cálcio presente na mistura. Uma alíquota de 1 mL de solução foi transferida para um tubo de ensaio e, em seguida adicionou-se 0,5 mL de ácido cloranílico. Após 30 minutos em repouso a solução foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm para promover a decantação do precipitado. O sobrenadante foi totalmente removido e 3 mL de álcool isopropílico (diluído a 50%) foi adicionado ao precipitado. A solução foi novamente centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm e mais uma vez o líquido sobrenadante foi removido, preservando-se o precipitado no tubo. Finalmente, adicionou-se 3 mL de solução de EDTA (aquosa a 5%) e, após a dissolução do precipitado a solução foi submetida à leitura a 520 nm.

Para todas as leituras foram feitas curvas-padrão de cálcio ou fosfato. Os resultados foram anotados em partes por milhão (ppm).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade. Os dados de grau de conversão foram analisados através de ANOVA de dois fatores (“monômero” e “presença de DCPD” como fatores principais) e teste de Tukey. Os dados de microdureza foram analisados através de ANOVA de três fatores (“monômero”, “presença de DCPD” e “tempo de imersão”) e teste de Tukey. Os dados de resistência à flexão biaxial, módulo de elasticidade e liberação de íons foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Dunn. A existência de correlações entre a liberação de íons e propriedades mecânicas foi verificada através de análises de regressão. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 GRAU DE CONVERSÃO

Os resultados de grau de conversão após 24 horas de armazenamento em estufa a 37°C são apresentados na figura 5.1. O grau de conversão de compósitos à base de BisGMA foi estatisticamente maior quando comparados aos compósitos formulados com BisEMA, independentemente da presença de partículas de DCPD.

Figura 5.1 - Médias de grau de conversão dos compósitos testados no estudo. A barra de erro representa desvio padrão de ± 1 . Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre grupos (ANOVA de dois fatores/teste de Tukey, $p < 0,05$)

5.2 RESISTÊNCIA À FLEXÃO BIAXIAL E MÓDULO FLEXURAL

Os resultados de resistência à flexão biaxial são apresentados na figura 5.2. Após 24 horas de armazenamento, a substituição de 10 vol% de vidros de bário por DCPD provocou reduções estatisticamente significantes na RFB independentemente do monômero-base. Esta diferença se manteve aos 30 dias; porém, aos 60 dias e aos 90 dias não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os compósitos com e sem DCPD para um mesmo monômero-base. Os compósitos com BisEMA não apresentaram reduções estatisticamente significantes ao longo dos períodos de imersão. As reduções percentuais foram de 2% para o controle e 15% para o material bioativo. Por outro lado, os materiais contendo BisGMA apresentaram reduções estatisticamente significantes, de 29% para o controle e 18% para o material com DCPD. Como consequência, apesar do monômero-base não ter influenciado os valores de RFB após 1 dia de imersão (tanto para os controles quanto para os materiais com DCPD), os compósitos à base de BisGMA apresentaram valores mais baixos após 90 dias quando comparados aos materiais contendo BisEMA ($H=82,92$, $p<0,001$).

Figura 5.2 - Médias de RFB (MPa) dos compósitos testados. A barra de erro representa ± 1 desvio padrão. Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre períodos de armazenamento para um mesmo material; letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre materiais para um mesmo período de imersão (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$)

O módulo flexural após 1 dia de imersão foi afetado pela substituição das partículas de vidro pelo DCPD apenas para o compósito à base de BisGMA (Figura 5.3). Além disso, o compósito controle contendo BisGMA apresentou maior módulo do que o material com BisEMA. Novamente, os compósitos à base de BisEMA não apresentaram reduções estatisticamente significantes entre 1 dia e 90 dias (controle: 2%, com DCPD: 13%), enquanto que os materiais contendo BisGMA apresentaram reduções de 22% para o material com DCPD e 30% para o controle. Após 90 dias de armazenamento, os materiais controle e bioativo à base de BisEMA apresentaram valores de módulo flexural estatisticamente semelhantes e superiores ao material bioativo contendo BisGMA. ($H=49,48$, $p < 0,001$).

Figura 5.3 - Médias de módulo flexural (GPa) dos compósitos testados no estudo. A barra de erro representa ± 1 desvio padrão. Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre períodos de armazenamento para um mesmo material; letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre materiais para um mesmo período de imersão (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$)

5.3 MICRODUREZA

Os resultados de microdureza são apresentados na figura 5.4. A interação de segunda ordem (DCPD x monômero-base x tempo) foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Após um dia de imersão, a presença de DCPD não provocou reduções estatisticamente significantes para nenhum monômero-base. Além disso, enquanto o controle com BisGMA apresentou KHN estatisticamente superior ao controle com BisEMA, os dois compósitos bioativos apresentaram valores iniciais de KHN estatisticamente semelhantes. Como observado para RFB e módulo flexural, os compósitos com BisEMA não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na KHN entre um dia e 90 dias; adicionalmente, para este monômero não houve diferença entre o material controle e o material bioativo após 90 dias. Por outro lado, os compósitos contendo BisGMA apresentaram reduções estatisticamente significantes entre um e 90 dias (controle: 35%, com DCPD: 44%), sendo que o

compósito com DCPD apresentou KHN inferior ao do controle para este monômero. Com isso, os compósitos com BisEMA apresentaram valores finais de KHN superiores aos dos materiais com BisGMA.

Figura 5.4 - Médias de microdureza Knoop (KHN) dos compósitos testados no estudo. A barra de erro representa desvio padrão de ± 1 . Letras maiúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre períodos de armazenamento para um mesmo material; letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre materiais para um mesmo período de imersão (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$)

5.4 LIBERAÇÃO DE ÍONS

As médias e respectivos desvios-padrão das concentrações de cálcio liberadas pelos compósitos são apresentados na figura 5.5. De modo geral, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os materiais com diferentes monômeros, exceto após 60 dias de armazenamento. Os dois materiais apresentaram padrões de liberação semelhantes, com maiores concentrações tendo sido liberadas aos 60 e 90 dias. Deve-se ressaltar que mesmo não tendo sido detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os materiais, os valores liberados pelo compósito com BisGMA aos 60 e 90 dias foram cerca de duas vezes maiores do que os valores liberados pelo compósito com BisEMA. ($H=67,06$, $p<0,001$).

Figura 5.5 - Médias das concentrações de cálcio encontradas no meio de imersão em função do tempo (ppm) para os compósitos contendo DCPD. A barra de erro representa ± 1 desvio padrão. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significantes entre períodos de armazenamento para um mesmo material e o asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre materiais em um dado período de observação (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$).

As médias e respectivos desvios-padrão das concentrações de fósforo liberadas pelos compósitos são apresentadas na figura 5.6. O compósito à base de BisGMA apresentou liberação estatisticamente significante maior do que o compósito com BisEMA em todos os períodos de imersão, exceto após um dia. Para os dois materiais, a liberação após 60 dias foi superior às concentrações encontradas aos 30 e 90 dias ($H=63,61$ $p < 0,001$).

Figura 5.6 - Médias das concentrações de fósforo encontradas no meio de imersão em função do tempo (ppm) para os compósitos contendo DCPD. A barra de erro representa ± 1 desvio padrão. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significativas entre períodos de armazenamento para um mesmo material e o asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre materiais em um dado período de observação (Kruskal-Wallis/teste de Dunn, $p < 0,05$)

As figuras 5.7 e 5.8 mostram as análises de regressão entre as concentrações de cálcio e hidrogênio fosfato, respectivamente, liberadas pelo compósito contendo BisGMA e as propriedades mecânicas destes materiais. Não foram feitas análises de regressão com os dados do compósito contendo BisEMA, pois os valores das propriedades mecânicas para este material não apresentaram variações significativas entre os períodos de imersão. Uma forte correlação linear indireta foi encontrada entre a liberação de cálcio e os valores de módulo de elasticidade, indicando que ao longo do período de imersão a liberação de cálcio foi proporcional à redução no módulo flexural do material. Uma relação menos evidente foi encontrada entre a liberação de cálcio e a microdureza superficial. Não foi detectada correlação linear entre liberação de cálcio e resistência à flexão. As regressões envolvendo as concentrações de hidrogênio fosfato mostraram coeficientes menores do que as regressões envolvendo cálcio. Novamente, o maior coeficiente foi encontrado na correlação com o módulo flexural.

Figura 5.7 - Análises de regressão entre liberação de cálcio e propriedades mecânicas para os compósitos contendo BisGMA (A: resistência à flexão, B: módulo flexural, C: microdureza Knoop)

Figura 5.8 - Análises de regressão entre liberação de hidrogênio fosfato e propriedades mecânicas para os compósitos contendo BisGMA (A: resistência à flexão, B: módulo flexural, C: microdureza Knoop)

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito da substituição de 10% em volume de partículas de reforço por nanopartículas de DCPD no grau de conversão, propriedades mecânicas e liberação de íons após diferentes tempos de armazenamento. O grau de conversão não foi afetado pela adição de partículas bioativas, o que pode ser explicado pela semelhança entre os índices de refração do DCPD (1,54-1,55) [70] e do vidro de bário (1,53) [71]. Este resultado é importante visto que diferenças nas propriedades mecânicas não podem ser atribuídas a diferenças na conversão entre materiais. Por outro lado, o grau de conversão foi afetado pelo monômero-base utilizado. Embora a diferença tenha sido pequena, foi estatisticamente significativa. Compósitos à base de BisGMA demonstraram valores mais altos quando comparados a materiais contendo BisEMA em sua formulação. Este resultado contradiz o que é geralmente encontrado na literatura, pois materiais à base de BisGMA apresentam geralmente menores valores de grau de conversão [19, 23, 72, 73]. O maior grau de conversão apresentado pelos compósitos à base de BisGMA pode ser explicado pelo efeito sinérgico do BisGMA quando associado ao TEGDMA, ou seja, o grau de conversão do copolímero é maior do que o grau de conversão dos homopolímeros correspondentes (em proporções entre 50:50 ou 70:30 em massa, respectivamente) [22, 74]. Esta sinergia acontece pois o TEGDMA possui três ligações éter, o que confere maior flexibilidade à molécula e, conseqüentemente, maior possibilidade de reticulação [62]. O BisEMA, por outro lado, apresenta as ligações éter protegidas por grupos funcionais maiores, o que não permite uma reticulação tão eficiente. [22, 74].

Quanto às propriedades mecânicas dos compósitos estudados, é importante frisar duas características essenciais. Primeiramente, a degradação hidrolítica da matriz polimérica está relacionada às características dos monômeros presentes em sua composição. O BisGMA, por exemplo, apresenta maior sorção de água quando comparado ao BisEMA, provavelmente devido ao caráter mais hidrofílico das suas unidades monoméricas. Os grupos hidroxila presentes no BisGMA formam ligações de hidrogênio mais fortes com as moléculas de água do que os grupos éter presentes na molécula de BisEMA [22]. A menor sorção de água apresentada pelo homopolímero de BisEMA reduz sua degradação em água em comparação ao homopolímero de BisGMA [23].

Um segunda característica importante é o efeito da incorporação de DCPD. A falta de uma ligação forte entre as partículas de DCPD e a matriz resinosa faz com que as partículas se comportem como defeitos, facilitando assim a iniciação e propagação de trincas sob cargas relativamente baixas [12, 13, 15, 75-77]. Adicionalmente, o fato dos aglomerados de partículas CaP apresentarem resistência coesiva muito menor que o vidro de bário compromete ainda mais a função de reforço [12, 15, 75-77].

A redução nos valores de resistência à fratura demonstram que materiais à base de BisGMA apresentaram uma degradação mais severa ao longo dos 90 dias de armazenamento quando comparados aos compósitos contendo BisEMA, confirmando os achados de pesquisas anteriores [22, 23]. É interessante notar que a substituição de partículas de vidro de bário por partículas bioativas afetou negativamente a resistência do compósitos até 30 dias para as duas matrizes utilizadas, o que concorda com a maior parte dos trabalhos que avaliaram o efeito do armazenamento de compósitos contendo CaP por 28 dias [9, 13, 24, 27]. Contudo, aos 60 e 90 dias, não foi constatada diferença na resistência à fratura entre o material controle e o material bioativo deixa de existir. Este fato reforça a necessidade de estudos desta natureza incluírem períodos de armazenamento maiores do que quatro semanas a fim de se evitar conclusões erradas.

Por outro lado, a presença de DCPD afetou o módulo flexural inicial e final (24 horas e 90 dias, respectivamente) do material à base de BisGMA em relação ao seu controle. Semelhante ao observado para RFB, materiais à base de BisEMA não demonstraram redução no módulo flexural ao longo do tempo de armazenamento. Além disso, a substituição de vidro por DCPD não afetou os valores de módulo em nenhum dos períodos avaliados. Nas primeiras 24 horas observou-se um valor de módulo mais elevado para o compósito controle à base de BisGMA quando comparado a todos os demais materiais. Este fato se deve à estrutura química da molécula, pois, apesar das unidades monoméricas do BisGMA e do BisEMA possuírem aproximadamente a mesma estrutura química (Figura 4.1), o primeiro polímero possui um par de grupos hidroxila, que formam pontes de hidrogênio entre as cadeias, aumentando a rigidez da rede polimérica. Após imersão prolongada, essas ligações são quebradas pelas moléculas de água, que competem pela formação de pontes de hidrogênio, provocando uma maior degradação deste material [22].

A KHN foi a propriedade mecânica mais afetada pela composição da matriz orgânica provavelmente pelo fato da KHN ser uma propriedade de superfície e esta ser mais suscetível a trocas com o meio. Novamente, materiais contendo BisGMA apresentaram uma maior degradação quando comparados a compósitos à base de BisEMA, que por sua vez não demonstrou diferenças ao longo do tempo. Materiais com BisGMA, por serem mais hidrofílicos [22], apresentam um amolecimento da matriz orgânica, o que também favoreceria a dissolução do DCPD. A incorporação de partículas de reforço por 10% de fosfato de cálcio afetou o material à base de BisGMA a partir dos 30 dias, o que reforça a hipótese de que a redução da microdureza se deva à dissolução dos aglomerados de DCPD, e não à degradação da matriz [12, 15, 75-77].

Quanto à liberação de íons cálcio, de modo geral não houve diferenças marcantes entre os valores liberados pelos compósitos com diferentes monômeros-base. Além disso, os valores liberados aumentaram ao longo de todo o período de observação. Entretanto, deve-se ressaltar que os valores liberados pelo compósito com BisGMA aos 60 e 90 dias foram cerca de duas vezes maiores do que os valores liberados pelo compósito com BisEMA. Concentrações acumuladas até 56 dias em pH neutro alcançaram uma liberação de cálcio aproximadamente 17% maior que este trabalho aos 60 dias, contudo o maior valor de liberação possivelmente se deve ao fato do estudo de 56 dias ter usado 30% em massa de CaP contra os 10% deste estudo [28].

Em relação a liberação de fosfato, não foi diferente do estudo avaliando 70 dias em pH ácido [51], ou seja, maiores liberações estatisticamente significantes para os materiais à base de BisGMA. Essa maior saída para o meio de íons fósforo de compósitos contendo BisGMA e, concomitantemente, a redução das propriedades mecânicas em geral dos materiais utilizando esta matriz orgânica sugere que a liberação de fosfato tem um reflexo mais evidente na redução das propriedades mecânicas do que a saída de cálcio do material. Uma hipótese para este achado seria que a saída de fosfato indicaria uma maior desagregação do aglomerado de DCPD, uma vez que os tetraedros do fosfato formam a estrutura do composto, enquanto que os íons cálcio estão presentes nos espaços entre estes tetraedros.

As concentrações de fosfato liberadas nestes estudo foram maiores tanto aos 30 quanto aos 60 dias em relação ao um estudo semelhante, mesmo considerando-se a menor proporção em massa de partículas de CaP. Esta maior liberação se deve

provavelmente ao tipo de ortofosfato de cálcio utilizado em cada estudo, o DCPD do estudo em questão é mais solúvel que o DCPA usado no estudo comparativo de 56 dias [78].

Liberações de íons cálcio são geralmente maiores quando comparadas a liberações de HPO_4^{2-} [13, 15, 24, 27, 28, 51]. Isto se deve a estrutura atômica do HPO_4^{2-} . Partículas de ortofosfatos de cálcio são compostas por tetraedros de hidrogênio fosfato, que possuem papel estrutural no composto, dessa maneira sua natureza poliatômica apresenta uma maior dificuldade em sair do material resinoso para a solução [13].

A análise de correlação entre liberação de íons e propriedades mecânicas foi demonstrada somente para materiais à base de BisGMA. Compósitos contendo BisEMA não apresentaram variações significativas entre os períodos de imersão. Para o BisGMA uma forte correlação linear indireta foi encontrada entre a liberação de íons cálcio e os valores de módulo de elasticidade. Isto se deve, provavelmente, ao fato de ocorrer uma dissolução das partículas de ortofosfato de cálcio, diminuindo o embricamento mecânico inicial dos aglomerados à matriz resinosa. No entanto, não se pode afirmar, com base neste delineamento, que se trata de uma relação de causa e efeito. Para tal afirmação seria necessário outro delineamento experimental envolvendo outros fatores.

De modo geral, compósitos à base de BisGMA, quando comparados a materiais contendo BisEMA, apresentaram maior liberação de íons e maior degradação ao longo do estudo. Esta degradação mais significativa, evidenciada pelos resultados inferiores nas propriedades mecânicas destes materiais, pode ser explicada pela maior sorção de água pela estrutura polimérica [23, 79].

Desta forma, todas as hipóteses nulas testadas devem ser rejeitadas.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados expostos, é possível concluir que:

- 1) A substituição de 10 vol% de partículas de vidros de bário por partículas de fosfato dicálcico dihidratado afetou a RFB e o módulo flexural iniciais dos compósitos, sendo esta última somente para materiais à base de BisGMA. Compósitos com BisGMA apresentaram maior grau de conversão, independentemente da presença de DCPD, bem como maiores valores de E e KHN no caso dos materiais controle (sem DCPD). Portanto a primeira hipótese nula testada deve ser rejeitada.
- 2) Apenas os compósitos à base de BisGMA apresentaram reduções estatisticamente significantes das propriedades mecânicas (RFB, E e KHN) após 90 dias de imersão. Desta forma, a segunda hipótese nula deve ser rejeitada.
- 3) Ao final de 90 dias, as concentrações de cálcio não apresentaram diferenças entre os monômeros-base; entretanto, o compósito à base de BisGMA liberou concentrações mais altas de fosfato do que o compósito contendo BisEMA. Em vista disso, a terceira hipótese nula testada deve ser rejeitada.
- 4) As concentrações de cálcio liberadas pelo compósito à base de BisGMA apresentaram correlação com as variações nos valores de módulo flexural observadas ao longo do período de imersão. Portanto a quarta hipótese nula deve ser rejeitada.

REFERÊNCIAS

1. Demarco FF, Correa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dent Mater* 2012;28(1):87-101.
2. 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.
3. Lempel E, Toth A, Fabian T, Krajczar K, Szalma J. Retrospective evaluation of posterior direct composite restorations: 10-year findings. *Dent Mater* 2015;31(2):115-22.
4. Weir MD, Chow LC, Xu HH. Remineralization of demineralized enamel via calcium phosphate nanocomposite. *J Dent Res* 2012;91(10):979-84.
5. Skrtic D, Antonucci JM. Dental composites based on amorphous calcium phosphate - resin composition/physicochemical properties study. *J Biomater Appl* 2007;21(4):375-93.
6. 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.
7. Rodrigues MC, Natale LC, Arana-Chaves VE, Braga RR. Calcium and phosphate release from resin-based materials containing different calcium orthophosphate nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2015;103(8):1670-8.
8. Aljabo A, Xia W, Liaqat S, Khan MA, Knowles JC, Ashley P, et al. Conversion, shrinkage, water sorption, flexural strength and modulus of re-mineralizing dental composites. *Dent Mater* 2015;31(11):1279-89.
9. 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.

10. 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.
11. Silverstone LM. Remineralization of human enamel in vitro. *Proc R Soc Med* 1972;65(10):906-8.
12. Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED. Improved properties of amorphous calcium phosphate fillers in remineralizing resin composites. *Dent Mater* 1996;12(5):295-301.
13. Chiari MD, Rodrigues MC, Xavier TA, de Souza EM, Arana-Chavez VE, Braga RR. Mechanical properties and ion release from bioactive restorative composites containing glass fillers and calcium phosphate nano-structured particles. *Dent Mater* 2015;31(6):726-33.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Souza MO, Leitune VC, Rodrigues SB, Samuel SM, Collares FM. One-year aging effects on microtensile bond strengths of composite and repairs with different surface treatments. *Braz Oral Res* 2017;31:e4.
19. Fonseca AS, Labruna Moreira AD, de Albuquerque PP, de Menezes LR, Pfeifer CS, Schneider LF. Effect of monomer type on the CC degree of conversion, water sorption and solubility, and color stability of model dental composites. *Dent Mater* 2017;33(4):394-401.

20. Salgado VE, Cavalcante LM, Moraes RR, Davis HB, Ferracane JL, Schneider LF. Degradation of optical and surface properties of resin-based composites with distinct nanoparticle sizes but equivalent surface area. *J Dent* 2017;59:48-53.
21. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12(2):136-51.
22. 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.
23. Gajewski VE, Pfeifer CS, Froes-Salgado NR, Boaro LC, Braga RR. Monomers used in resin composites: degree of conversion, mechanical properties and water sorption/solubility. *Braz Dent J* 2012;23(5):508-14.
24. Alania Y, Chiari MD, Rodrigues MC, Arana-Chavez VE, Bressiani AH, Vichi FM, et al. Bioactive composites containing TEGDMA-functionalized calcium phosphate particles: Degree of conversion, fracture strength and ion release evaluation. *Dent Mater* 2016.
25. 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.
26. Xu JX, Albrecht E, Viergutz T, Nurnberg G, Zhao RQ, Wegner J. Perilipin, C/EBPalpha, and C/EBPbeta mRNA abundance in longissimus muscle and different adipose tissues of Holstein and Charolais cattle. *Meat Sci* 2009;83(1):120-6.
27. Xu HH, Moreau JL, Sun L, Chow LC. Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition. *Dent Mater* 2011;27(8):762-9.
28. 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.
29. 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.

30. Lalidou F, Kolios G, Drosos GI. Bone infections and bone graft substitutes for local antibiotic therapy. *Surg Technol Int* 2014;24:353-62.
31. Cheng L, Wang T, Zhu J, Cai P. Osteoinduction of Calcium Phosphate Ceramics in Four Kinds of Animals for 1 Year: Dog, Rabbit, Rat, and Mouse. *Transplant Proc* 2016;48(4):1309-14.
32. 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.
33. Epple 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.
34. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chem Rev* 2008;108(11):4628-69.
35. 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.
36. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 1991;15:1-201.
37. Dorozhkin SV. Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates. *Biomater* 2011;1(1):3-56.
38. Larsen MJ, Pearce EI. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Arch Oral Biol* 2003;48(4):317-22.
39. Parry JA, Olthof MG, Shogren KL, Dadsetan M, Van Wijnen A, Yaszemski M, et al. Three-Dimension-Printed Porous Poly(Propylene Fumarate) Scaffolds with Delayed rhBMP-2 Release for Anterior Cruciate Ligament Graft Fixation. *Tissue Eng Part A* 2017.
40. Barber FA, Dockery WD, Hrnack SA. Long-term degradation of a poly-lactide co-glycolide/beta-tricalcium phosphate biocomposite interference screw. *Arthroscopy* 2011;27(5):637-43.

41. 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.
42. Kozlova D CS, Knuschke T, Buer J, Westendorf AM, Eppele M. Cell targeting by antibody-functionalized calcium phosphate nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*. 2012:396–404.
43. van Oirschot BA, Bronkhorst EM, van den Beucken JJ, Meijer GJ, Jansen JA, Junker R. A systematic review on the long-term success of calcium phosphate plasma-spray-coated dental implants. *Odontology* 2016;104(3):347-56.
44. Wu CC, Tsai YF, Hsu LH, Chen JP, Sumi S, Yang KC. A self-reinforcing biodegradable implant made of poly(varepsilon-caprolactone)/calcium phosphate ceramic composite for craniomaxillofacial fracture fixation. *J Craniomaxillofac Surg* 2016;44(9):1333-41.
45. 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.
46. 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.
47. Chow CK, Wu CD, Evans CA. In vitro properties of orthodontic adhesives with fluoride or amorphous calcium phosphate. *Int J Dent* 2011;2011:583521.
48. Camacho Rde C, Miranda GL, Oliveira FT, Ribeiro FV, Pimentel SP, Casarin RC. Efficacy of different "in-office" desensitizing treatment methods: An in vitro SEM analysis. *Am J Dent* 2015;28(6):342-6.
49. 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.
50. de Oliveira AF, de Oliveira Diniz LV, Forte FD, Sampaio FC, Ccahuana-Vasquez RA, Tochukwu Amaechi B. In situ effect of a CPP-ACP chewing gum on enamel erosion associated or not with abrasion. *Clin Oral Investig* 2016.

51. Zhang L, Weir MD, Chow LC, Antonucci JM, Chen J, Xu HH. Novel rechargeable calcium phosphate dental nanocomposite. *Dent Mater* 2016;32(2):285-93.
52. 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.
53. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, et al. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent Mater* 2012;28(5):561-72.
54. Xu HH, Sun L, Weir MD, Antonucci JM, Takagi S, Chow LC, et al. Nano DCPA-whisker composites with high strength and Ca and PO(4) release. *J Dent Res* 2006;85(8):722-7.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Liu Q, de Wijn JR, de Groot K, van Blitterswijk CA. Surface modification of nano-apatite by grafting organic polymer. *Biomaterials* 1998;19(11-12):1067-72.
59. Rodrigues MC, Xavier TA, Arana-Chavez VE, Braga RR. Polymer-based material containing calcium phosphate particles functionalized with a dimethacrylate monomer for use in restorative dentistry. *J Biomater Appl* 2016.
60. Cotugno S, Larobina D, Mensitieri G, Musto P, Ragosta G. A novel spectroscopic approach to investigate transport processes in polymers: the case of water–epoxy system. *Polymer* 2001;42(15):6431-8.

61. Sideridou ID, Karabela MM, Vouvoudi EC. Dynamic thermomechanical properties and sorption characteristics of two commercial light cured dental resin composites. *Dental Materials* 2008;24(6):737-43.
62. Lemon MT, Jones MS, Stansbury JW. Hydrogen bonding interactions in methacrylate monomers and polymers. *J Biomed Mater Res A* 2007;83(3):734-46.
63. Alshali RZ, Salim NA, Satterthwaite JD, Silikas N. Long-term sorption and solubility of bulk-fill and conventional resin-composites in water and artificial saliva. *J Dent* 2015;43(12):1511-8.
64. Skrtic D, Antonucci JM. Effect of bifunctional comonomers on mechanical strength and water sorption of amorphous calcium phosphate- and silanized glass-filled Bis-GMA-based composites. *Biomaterials* 2003;24(17):2881-8.
65. Versluis A, Tantbirojn D, Douglas WH. Do dental composites always shrink toward the light? *J Dent Res* 1998;77(6):1435-45.
66. Fronza BM, Rueggeberg FA, Braga RR, Mogilevych B, Soares LE, Martin AA, et al. Monomer conversion, microhardness, internal marginal adaptation, and shrinkage stress of bulk-fill resin composites. *Dent Mater* 2015;31(12):1542-51.
67. Fiske CH, Subbarow Y. THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS. *Journal of Biological Chemistry* 1925;66(2):375-400.
68. Patrick U, B. S. Ferro, A. B. Patrick U, B. S. Ferro , Ham AB. *Práticas de Químicas Biológicas*. Ham. 1963.
69. Ferro PV, Ham AB. A simple spectrophotometric method for the determination of calcium. *American Journal of Clinical Pathology* 1957;28:208-17.
70. Anthony JW BR, Bladh KW, Nichols MC, editors. *Handbook of Mineralogy*. Mineralogical Society of America, Chantilly, VA 20151-1110, USA. ; 2000.
71. Shortall AC, Palin WM, Burtscher P. Refractive Index Mismatch and Monomer Reactivity Influence Composite Curing Depth. *Journal of Dental Research* 2008;87(1):84-8.

72. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2002;23(8):1819-29.
73. 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. *Dental Materials*;25(9):1136-41.
74. Cook WD, Moopnar M. Influence of chemical structure on the fracture behaviour of dimethacrylate composite resins. *Biomaterials* 1990;11(4):272-6.
75. Antonucci JM, Fowler BO, Venz S. Filler systems based on calcium metaphosphates. *Dental Materials*;7(2):124-9.
76. O'Donnell JNR, Langhorst SE, Fow MD, Skrtic D, Antonucci JM. Light-Cured Dimethacrylate-Based Resins and Their Composites: Comparative Study of Mechanical Strength, Water Sorption, and Ion Release. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 2008;23(3):207-26.
77. Zhao J-C, Zheng X, Cahill DG. High-throughput measurements of materials properties. *JOM* 2011;63(3):40-4.
78. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomatter* 2011;1(2):121-64.
79. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials* 2005;26(33):6449-59.