

**FACULDADE SETE LAGOAS – FACSETE
ODONTOLOGIA**

RAFAEL SANTANA MENDES

**EFEITO DA INSERÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE
CÁLCIO NA MATRIZ DO IONÔMERO DE VIDRO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

SETE LAGOAS, MG

2019

RAFAEL SANTANA MENDES

**EFEITO DA INSERÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE
CÁLCIO NA MATRIZ DO IONÔMERO DE VIDRO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito à obtenção do
título de Bacharel em Odontologia, pela
Facsete.

Orientador: Prof. Dr. Vítor Cezar Dumont
Co-orientador: Prof. Dr. Adriana Gonçalves
Costa.

Professor da Disciplina de TCC II: Fabrício
Tinôco.

SETE LAGOAS, MG

2019

MENDES, Rafael Santana Mendes

EFEITO DA INSERÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE CÁLCIO
NA MATRIZ DO IONÔMERO DE VIDRO - MG, 2019. 44 f.: il

Orientador: Dumont, Vitor Cesar.

Coorientadora: Silva, Adriana
Gonçalves.

TCC (Graduação - ODONTOLOGIA) --
FACULDADE SETE LAGOAS - FACSETE, 2019.

1. Biocompósito. 2. Propriedades
mecânicas. 3. Fosfato de cálcio. I. Dumont,
Vitor Cesar. II. Silva, Adriana
Gonçalves. III. Título.

SIGLAS

β -TCP – β fosfato de tricálcio

CIV – Cimento de ionômero de vidro

DRX – Difração de Raios-X

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

FTIR – Transformada de Fourier espectroscopia no infravermelho

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

nCaP/CIV – Cimento de ionômero de vidro modificado com nanopartículas de fosfato de cálcio

SOL – Solução

SUS – Suspensão

TE – Espécime de teste

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO.....	7
MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
Materiais	8
Síntese de nanopartículas de fosfato de cálcio (nCaP).....	9
Preparação do biocompósito de ionômero de vidro	9
Avaliação de resistência a compressão e tração diametral	9
Caracterização de nCaP/CIV	10
RESULTADOS	11
CONCLUSÃO.....	12
AGRADECIMENTOS	13
REFERÊNCIAS	13
LEGENDAS DAS FIGURAS	15
LEGENDAS DAS TABELAS	16
APÊNDICE B – FICHA DE ACOMPANHAMENTO	24
APÊNDICE C – AUTORIZAÇÃO DO ORIENTADOR PARA ENTREGA DO TCC	26
APÊNDICE D – CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO.....	27
APÊNDICE E – TERMO DE RESPONSABILIDADE DO ALUNO.....	28

EFEITO DA INSERÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE CÁLCIO NA MATRIZ DO IONÔMERO DE VIDRO

Rafael S. Mendes ^(a), Rodrigo D. F. C. Pereira ^(b), Sandhra M. Carvalho ^(c), Cintia T. P. de Araújo ^(b), Adriana G. da Silva ^(a), Marcos A de Sá ^(c) e Vitor C. Dumont ^(a,c*)

^a Faculdade Sete Lagoas, FACSETE, Sete Lagoas CEP: 35700-170, MG, Brasil

^b Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, Diamantina CEP: 39100-000, MG, Brasil

^c Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte CEP: 31270-901, MG, Brasil

*vitorcdumont@gmail.com

RESUMO

Os cimentos de ionômero de vidro (CIV) apresentam limitações associadas à baixa resistência mecânica e friabilidade. Sintetizar nanopartículas de fosfato (nCaP) e modificar o CIV de média viscosidade. Os biocompósitos (nCaP/CIV) sintetizados foram submetidos à ensaios mecânicos de compressão e tração diametral, caracterizados por Microscopia Electrónica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia por Dispersão de Raios-X (EDS), Difração de Raios-X (DRX) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas quanto as propriedades mecânicas (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$), nCaP/CIV apresentou maior resistência a compressão e tração diametral em relação ao CIV. As partículas de fosfato de cálcio sintetizadas apresentaram um tamanho médio de (330 ± 70) nm e foram distribuídas uniformemente na matriz ionomérica. Os espectros de EDS apresentaram picos intensos de Ca e P atribuídos as nCaP, a proporção molar média (Ca/P) foi de 1:8 consistente com a razão estequiométrica da hidroxiapatita e β - trifosfato de cálcio. Picos característicos principais de HA em 2teta iguais a $31,7^\circ$ (2 1 1), $32,8^\circ$ (3 0 0), $32,2^\circ$ (1 1 2), e $25,9^\circ$ (0 0 2) (*International Centre for Diffraction Data, JCPDS 86- 1203*). Foram observados picos associados ao β fosfato de tricálcio (β -TCP) em 2 teta iguais a $28,0^\circ$, $31,2^\circ$ e $34,5^\circ$. Os espectros de FTIR revelaram a banda assimétrica do ν_3 PO_4^{3-} entre $1100\text{-}1030\text{cm}^{-1}$ e a banda de vibração associada ao ν_1 PO_4^{3-} em 963cm^{-1} associadas com as fases de fosfato de cálcio. Os compósitos desenvolvidos apresentaram fases cristalográficas e estruturas químicas características dos materiais precursores, caracterizando processo de modificação, melhorando suas propriedades limitantes, sendo um forte candidato na aplicação odontológica.

Palavras-chave: Biocompósito, Propriedades mecânicas, Fosfato de Cálcio.

ABSTRACT

Glass ionomer cements (GIC) result in the causes associated with low mechanical resistance and friability. Synthesize phosphate nanoparticles (nCaP) and modify the medium viscosity GIC. The biocomposites (nCaP / GIC) synthesized were subjected to mechanical compression and diametral tensile tests, characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), X-ray Dispersion Energy Spectroscopy (EDS), X-ray Diffraction (XRD) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Statistically significant differences were observed in mechanical properties (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$), nCaP / GIC presented higher resistance to compression and diametral traction in relation to GIC. The synthesized calcium phosphate particles had an average size of (330 ± 70) nm and were uniformly distributed in the ionic matrix. EDS spectra showed intense Ca and P peaks attributed to nCaP, the mean molar ratio (Ca / P) was 1: 8 consistent with the stoichiometric ratio of hydroxyapatite and calcium β -triphosphate. Principal characteristic peaks of HA in 2theta equal to 31.7° (2 1 1), 32.8° (3 0 0), 32.2° (1 1 2), and 25.9° (0 0 2) (*International Center for Diffraction Data, JCPDS 86-1203*). Peaks associated with β -tricalcium phosphate (β -TCP) were observed in 2 theta equal to 28.0° , 31.2° and 34.5° . The FTIR spectra revealed the asymmetric band of $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ between $1100\text{-}1030\text{cm}^{-1}$ and the vibration band associated with $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ in 963cm^{-1} associated with the calcium phosphate phases. The developed composites presented crystallographic phases and chemical structures characteristic of the precursor materials, characterizing the modification process. The limiting properties, being a strong candidate in the dental application.

Keywords: Biocomposite, Mechanical Properties, Calcium Phosphate.

INTRODUÇÃO

Os cimentos de ionômero de vidro (CIV) tornaram-se um material de destaque na odontologia sendo amplamente usados por agregar propriedades físicas e biológicas satisfatórias. A adesão à estrutura dentária caracterizada pela interação química dos grupamentos carboxílicos dos poliácidos aos íons cálcio dos tecidos dentários, a baixa contração e expansão durante a reação de presa e o coeficiente de expansão térmica semelhante ao da estrutura dentária minimizam a microinfiltração na interface dente/restauração [1-4].

A sua natureza anticariogênica associado à biocompatibilidade e liberação de flúor atuam na remineralização dos tecidos dentários e no controle da recidiva de cárie

descartando a necessidade de remoção total da dentina afetada e amolecida para controle da progressão da cárie dentária [2-5].

O uso do CIV como material restaurador direto apresenta algumas limitações associadas à sua baixa resistência mecânica (abrasão e flexural), friabilidade, alto módulo de elasticidade e deteriorização em pH ácido sendo frágeis e propensos à fratura [2,3,6].

Modificações dos cimentos de ionômero de vidro com metais, polímeros e cerâmicas em diferentes escalas métricas foram propostas com intuito de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas [3,4,7-12].

Neste contexto, o uso de biomateriais a base de fosfato de cálcio (CaP) são de especial interesse por melhorar as propriedades mecânicas, incorporar características topográficas na escala nanométrica que mimetizam a nanoestrutura do dente natural e estabelecer relação íntima e funcional com o tecido adjacente [13-18]. A quantidade de fosfato de cálcio incorporado requer compatibilidade entre as nanopartículas e a matriz polimérica, influenciando significativamente na capacidade de molhabilidade e na viscosidade do compósito. [19].

Numerosos estudos com partículas de fosfato de cálcio adicionados a compósitos demonstraram melhorias quanto as propriedades mecânicas [1,3-12,19,20]. No entanto, nenhum estudo foi relatado na literatura envolvendo as fases de hidroxiapatita e β TCP do fosfato de cálcio na modificação do cimento de ionômero de vidro para a melhoria das propriedades mecânicas e diminuição da citotoxicidade.

O objetivo deste estudo foi modificar um cimento de ionômero de vidro com nanopartículas de fosfato de cálcio, avaliar a resistência a compressão e tração diametral, e caracterizar por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia por Dispersão de Raios-X (EDS), Difração e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Todos os reagentes e precursores, ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, EUA, 85%, H_3PO_4) e hidróxido de cálcio (Sigma-Aldrich, EUA, $\geq 96\%$, $Ca(OH)_2$) foram utilizados. O cimento de ionômero de vidro (Maxxion R, FGM, Brasil) foi utilizado como precursor para a síntese do nCaP/CIV pela modificação química. A água deionizada (Millipore Simplicidade™) com resistividade de 18M Ω /cm foi utilizada na preparação de todas as

soluções. Todas as preparações e síntese foram realizadas à temperatura ambiente, (25±2)°C, a menos que especificado. O brometo de potássio (Sigma-Aldrich, EUA, ≥ 99%, KBr), adequado para espectroscopia, foi utilizado para preparar as paletas de FTIR.

Síntese de nanopartículas de fosfato de cálcio (nCaP)

Partículas nCaP foram sintetizados a partir de co-precipitação, à temperatura ambiente. Precursores foram preparados como se segue: 0,6ml de H₃PO₄ foi adicionada lentamente a 99,4ml de água deionizada, sob agitação magnética durante 15min. Esta solução precursora de fosfato foi referido como "SOL_1". Aproximadamente 1,1g de Ca(OH)₂ em pó foi adicionado a 10ml de água deionizada e agitou-se vigorosamente durante 15min. Esta suspensão de cálcio foi referido como "SUS_1". Em seguida, "SUS_1" foi adicionada lentamente à "SOL_1" para a reação de síntese da tampa, esta mistura ("SUS_2") foi agitada magneticamente durante 1h. Na sequência, esta mistura foi deixada em repouso durante 24h à temperatura ambiente. O sobrenadante foi decantado a partir do material sólido. O precipitado foi submetido à filtração em vácuo utilizando papel de filtro adaptado num funil de Buchner, lavada 3 vezes com água deionizada e filtrou-se novamente. O material retido foi seco à temperatura ambiente durante 96h. A reação química de formação de tampa é representada na Equação 1 e a figura 1 apresenta o esquema da síntese do biocompósito de nCaP.

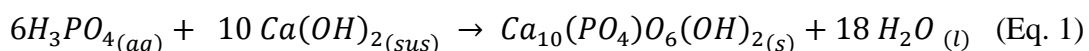


Figura 1

Preparação do biocompósito de ionômero de vidro

Da concentração total do CIV convencional foram adicionados a quantidade de 12% de nCaP, em seguida foi realizada a aglutinação com o líquido, seguindo as recomendações do fabricante. Dois grupos experimentais foram obtidos: Grupo 1 (G1-CIV) e Grupo 2 (G2-nCaP/CIV).

Avaliação de resistência a compressão e tração diametral

Espécimes de teste (TE) (n = 10) de cada grupo experimental, foram preparadas numa matriz de aço com 4mm de diâmetro e 8mm de comprimento, sendo 5 TE de cada grupo. Nos grupos, o cimento foi inserido na matriz sob pressão, usando uma seringa específica

(Centrix, DFL Ind., São Paulo, Brasil) para minimizar a formação de bolhas no corpo do cimento. Uma vez que a matriz foi completamente preenchida, uma tira de poliéster foi pressionada para a superfície do cimento para assegurar um fluxo adequado e uma superfície de material liso.

O TE de todos os grupos foram armazenadas durante 24h em água destilada a $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ e examinadas em uma máquina de teste universal Teste EZ (Shimadzu, Quioto, Japão) ligado a um microcomputador compatível, o qual foi instalado com a operação software de controle.

Para os ensaios de resistência à compressão, o TE ($n = 10$) foram posicionados com o seu eixo longitudinal na direção vertical e sujeito a uma célula de carga de 200kgf a uma velocidade de 1mm/min. Para o ensaio de resistência à tração diametral, as TE ($n = 10$) foram posicionados com o seu eixo longitudinal na direção horizontal e submetido à mesma força de compressão de 0,5mm/min. Neste ensaio, a carga foi aplicada verticalmente ao longo da parte lateral do espécime cilíndrico; portanto, a tensão de tração era perpendicular ao plano vertical.

A máquina de teste universal Teste EZ traz em seus resultados o valor referente ao módulo de elasticidade no momento em que é feito o ensaio mecânico.

Os resultados de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância testes (Levene) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e testes post-hoc de Tukey. Todas as análises foram realizadas ao nível $p < 0,05$ de significância.

Caracterização de nCaP/CIV

Microscopia eletrônica de varredura e análise de espectroscopia de raios X por dispersão de energia

A morfologia dos compósitos e partículas de fosfato de cálcio foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, FEI-INSPECTTM S50) acoplada a espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDX, EDAX GENESIS). Antes da análise, as amostras foram revestidas com uma fina película de carbono por deposição catódica utilizando baixa velocidade de deposição, o arrefecimento do substrato, e a distância máxima entre o alvo e a amostra de modo a evitar danos amostra. Imagens de elétrons secundários foram obtidos utilizando uma tensão de aceleração de 15kV.

Os dados de tamanho de partículas e distribuição de tamanho nCaP foram obtidos com base nas imagens de MEV, medindo pelo menos 100 nanopartículas selecionados

aleatoriamente usando um programa de processamento de imagens (ImageJ, versão 1.44, de domínio público, Institutos Nacionais de Saúde).

Difração de raios-X (DRX)

A cristalinidade das fases presentes nos biocompósitos foi acessado por difração de raios-X (DRX) padrões registados usando um difratômetro de PANalyticalX'Pert (radiação Cu-Ka com $\lambda = 1.5406\text{\AA}$). As medições foram efetuadas no intervalo de $15^\circ 2\theta$ a 75° com passos de $0,06^\circ$.

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada na gama de 650 a 4000cm^{-1} (Thermo Fischer, Nicolet 6700), utilizando o modo de transmissão. Os filmes foram colocados num suporte de amostras e imediatamente escaneados (16 scans) a uma resolução de 2cm^{-1} , com subtração de fundo. As amostras foram misturadas numa razão de 1% (% em peso) para KBr em pó seco a $(110\pm 5)^\circ\text{C}$ durante 2h. Espectros de FTIR de biocompósitos nCaP/CIV foram obtidos usando o método ATR.

RESULTADOS

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), em seguida foi aplicado o teste estatístico paramétrico (ANOVA) para verificar diferenças entre os grupos utilizando o Statistical Package for Social Sciences (SPSS para Windows, versão 17.0, SPSS Inc., USA). A análise estatística dos dados foi realizada com nível de significância de 95%.

Houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre o CIV convencional e o nCaP/CIV para os testes de resistência à compressão (RC) e resistência à tração diametral (RTD), sendo que o CIV apresentou $21,8\pm 6$ MPa e nCaP/CIV $39,2\pm 4$ quanto à resistência a compressão e de $24,4\pm 7$ para $47,1\pm 4$ respectivamente quanto a tração diametral (Tabela 1).

Tabela 1

Ocorreu ainda diferença estatisticamente significativa ao se comparar o CIV convencional e o nCaP/CIV para os testes de módulo de elasticidade quando à compressão e à tração diametral, sendo que o CIV apresentou 1011.9 ± 79 MPa e nCaP/CIV 1057.8 ± 23 MPa quanto ao módulo de elasticidade a compressão e de 524.8 ± 37 MPa para 812 ± 26 MPa respectivamente quanto a tração diametral. (Tabela 2).

Tabela 2

As avaliações morfológicas das nCaP mostram considerável heterogeneidade na forma das partículas sintetizadas (Figura 2A). Os espectros de EDS característicos estão apresentados na figura 2B apresentando picos associados aos elementos Ca e P, e uma razão Ca/P igual a 1,8, sugerindo a precipitação da fase de hidroxiapatita. O processo de síntese possibilitou a formação de partículas na escala nanométrica (Figura 2C).

Figura 2

A modificação do CIV permitiu a síntese de biocompósitos homogêneos com maior rugosidade superficial (Figura 3A). Os espectros de EDS apresentaram picos de Ca e P elementos atribuídos as nCaP como ilustrado na figura 3B. Além disso, as análises de mapeamento do Ca-K α revelaram que as partículas de nCaP estão uniformemente dispersas na matriz dos compósitos sem a detecção de qualquer segregação (Figuras 3C e 3D).

Figura 3

Os padrões de DRX das nCaP e nCaP/CIV apresentam picos bem definidos com perfis semelhantes (Figura 4). As partículas nCaP sintetizadas apresentaram os picos característicos principais de HA em 2 teta iguais a 31,7° (211), 32,8° (300), 32,2° (112), e 25,9° (002), entre outros picos de menores intensidades (International Centre for Diffraction Data, JCPDS 86- 1203). Foram observados também, três picos associados a fase do β fosfato de tricálcio (β -TCP) foram detectados em 2 teta iguais a 28,0°, 31,2° e 34,5°. Os padrões de DRX do CIV/nCaP apresentaram picos mais largos devido à presença dos polímeros amorfos, e um pico característico da fase hidroxiapatita em 2 theta em aproximadamente 28,0°.

Figura 4

A presença de fases secundárias, tais como α -TCP, β -TCP, CaO não foram detectadas. Os espectros de infravermelho dos biocompósitos revelaram a banda assimétrica do ν_3 PO $_4^{3-}$ entre 1100-1030cm $^{-1}$ e a banda de vibração associada ao ν_1 PO $_4^{3-}$ em 963cm $^{-1}$ associadas com as fases de fosfato de cálcio (Figura 5).

Figura 5

CONCLUSÃO

Os ensaios mecânicos indicaram um aumento na resistência e módulo de elasticidade devido a incorporação da nCaP. O nCaP/CIV mostrou-se superior no ponto vista morfológico e estrutural apresentando fases cristalográficas e estruturas químicas características do material precursor caracterizando processo de modificação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da CAPES, FAPEMIG e CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] R.M. Silva, et al. Dental glass ionomer cement reinforced by cellulose microfibers and cellulose nanocrystals. *Materials Science and Engineering C* 58 (2016) 389–395.
- [2] S Gurgan, ZB Kutuk, E Ergin, SS Oztas, and FY Cakir (2015) Four-year Randomized Clinical Trial to Evaluate the Clinical Performance of a Glass Ionomer Restorative System. *Operative Dentistry*: March/April 2015, Vol. 40, No. 2, pp. 134-143.
- [3] J.C. Souza et al. Effect of Zirconia and Alumina Fillers on the Microstructure and Mechanical Strength of Dental Glass Ionomer Cements. *Open Dent J*. 2016 Mar 15; 10:58-68. doi: 10.2174/1874210601610010058. eCollection 2016.
- [4] K Gorseta, D Glavina, Thermo-cured glass ionomer cements in restorative dentistry. *J Istanbul Univ Fac Dent*. 2017 Dec 2;51(3 Suppl 1):S122-S127. doi: 10.17096/jiufd.10280. eCollection 2017.
- [5] R.M. Silva et al. Biocompatibility of a New Dental Glass Ionomer Cement with Cellulose Microfibers and Cellulose Nanocrystals. *Brazilian Dental Journal* (2017) 28(2): 172-178.
- [6] M. S. Baig , G. J. Fleming, Conventional glass ionomer materials: A review of the developments in glass powder, polyacid liquid and the strategies of reinforcement. *J Dent*. 2015 Aug;43(8):897-912. doi: 10.1016/j.jdent.2015.04.004. Epub 2015 Apr 14.
- [7] A. Valanezhad et al. Modification of resin modified glass ionomer cement by addition of bioactive glass nanoparticles. *J Mater Sci Mater Med*. 2016 Jan;27(1):3. doi: 10.1007/s10856-015-5614-0. Epub 2015 Nov 26.
- [8] K. Tolidis et al. Comparative evaluation of microleakage of a carbomer/fluoroapatite-enhanced glass-ionomer cement on primary teeth restorations. *Eur J Paediatr Dent*. 2016 Sep;17(3):227-233.
- [9] M.A. Ibrahim et al. Characterization of antibacterial and adhesion properties of chitosan-modified glass ionomer cement. *J Biomater Appl*. 2015 Oct;30(4):409-19. doi: 10.1177/0885328215589672. Epub 2015 Jun 15.
- [10] J. Sangsuwan et al. Translationally controlled tumor protein supplemented chitosan modified glass ionomer cement promotes osteoblast proliferation and function. *Mater*

SciEng C Mater Biol Appl. 2015 Sep;54:61-8. doi: 10.1016/j.msec.2015.04.036. Epub 2015 Apr 24.

[11] P. Subramaniam et al. Does Addition of Propolis to Glass Ionomer Cement Alter its Physicomechanical Properties? An In Vitro Study. *J ClinPediatr Dent.* 2017;41(1):62-65. doi: 10.17796/1053-4628-41.1.62.

[12] S. N. Lima et al. Effect of Carbamide Peroxide on the Push-out Bond Strength of Different Composition Glass-Ionomer Cement to Root Canal Dentin when used as Cervical Barrier. *J Contemp Dent Pract.* 2015 Dec 1; 16(12):944-9.

[13] R. Masaeli et al. Efficacy of the biomaterials 3wt%-nanostrontium-hydroxyapatite-enhanced calcium phosphate cement (nanoSr-CPC) and nanoSr-CPC-incorporated simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic-acid) microspheres in osteogenesis improvement: An explorative multi-phase experimental in vitro/vivo study. *Mater SciEng C Mater Biol Appl.* 2016 Dec 1;69:171-83. doi: 10.1016/j.msec.2016.06.033. Epub 2016 Jun 16.

[14] M.A.S. Melo et al. Ph-activated nano-amorphous calcium phosphate-based cement to reduce dental enamel demineralization. *Artif Cells NanomedBiotechnol.* 2017 Dec;45(8):1778-1785. doi: 10.1080/21691401.2017.1290644. Epub 2017 Feb 21.

[15] M.A. Ekambaram et al. Review of Enamel Remineralisation Potential of Calcium- and Phosphate-based Remineralisation Systems. *Oral Health Prev Dent.* 2017;15(5):415-420. doi: 10.3290/j.ohpd.a38779.

[16] X.J. XIE et al. Novo cimento ortodôntico contendo nanopartículas de fosfato de cálcio recarregável. *Int J Oral Sci.* 2017 Mar; 9 (1): 24-32. doi: 10.1038 / ijos.2016.40.

[17] L. He et al. Novel tea polyphenol-modified calcium phosphate nanoparticle and its remineralization potential. *J Biomed Mater Res B ApplBiomater.* 2015 Nov;103(8):1525-31. doi: 10.1002/jbm.b.33333.

[18] L. Zhang et al. Rechargeable dental adhesive with calcium phosphate nanoparticles for long-term ion release. *J Dent.* 2015 Dec;43(12):1587-95. doi: 10.1016/j.jdent.2015.06.009.

[19] R. M. Silva, et al. Addition of mechanically processed cellulosic fibers to ionomer cement: mechanical properties. *Braz Oral Res [online].* 2015;29(1):1-8.

[20] S. Mickenautsch High-viscosity glass-ionomer cements for direct posterior tooth restorations in permanent teeth: The evidence in brief. *J Dent.* 2016 Dec;55:121-123. doi: 10.1016/j.jdent.2016.10.007. Epub 2016 Oct 17.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do processo de síntese das nanopartículas de CaP.

Figura 2 - Análise morfológica de nCaP ((A) imagem MEV). Análise química: espectros de EDS (B) e histograma do tamanho médio das nCaP (C).

Figura 3 - Análise morfológica de nCaP/CIV ((A) imagem MEV). Análise química: espectros de EDS (B) e mapeamento dos elementos Ca $K\alpha$ (C) e P $K\alpha$ (D).

Figura 4 - Espectros de DRX da referência CaP (ICDD-96-900-3549) (A), nCaP(B), CIV(C) e nCaP/CIV (D).

Figura 5 - Espectros de FTIR de biocompósitos nCa/CIV.

LEGENDAS DAS TABELAS

Tabela 1 - Valores médios (MPa) da resistência à compressão e tração diametral.

Tabela 2 -Módulo de elasticidade à compressão e à tração diametral.

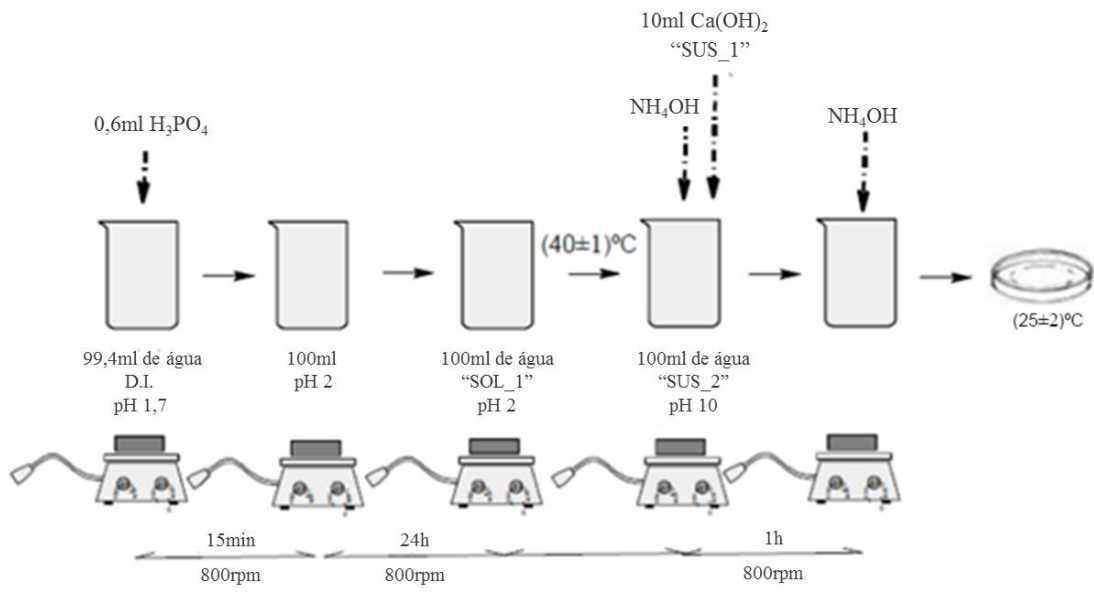


Figura 1

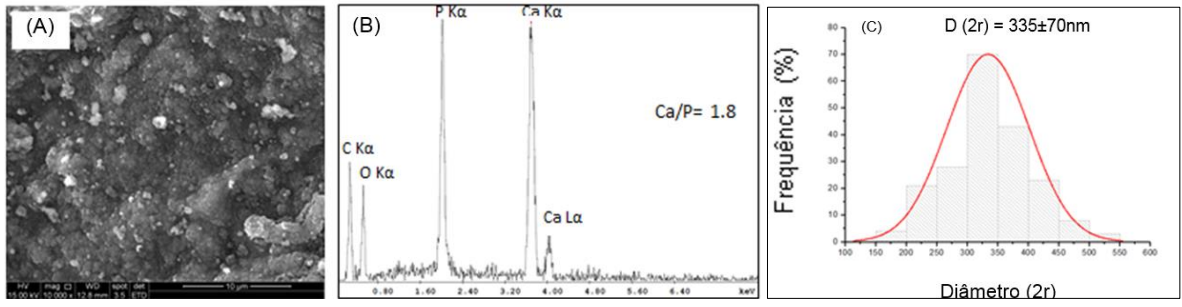


Figura 2

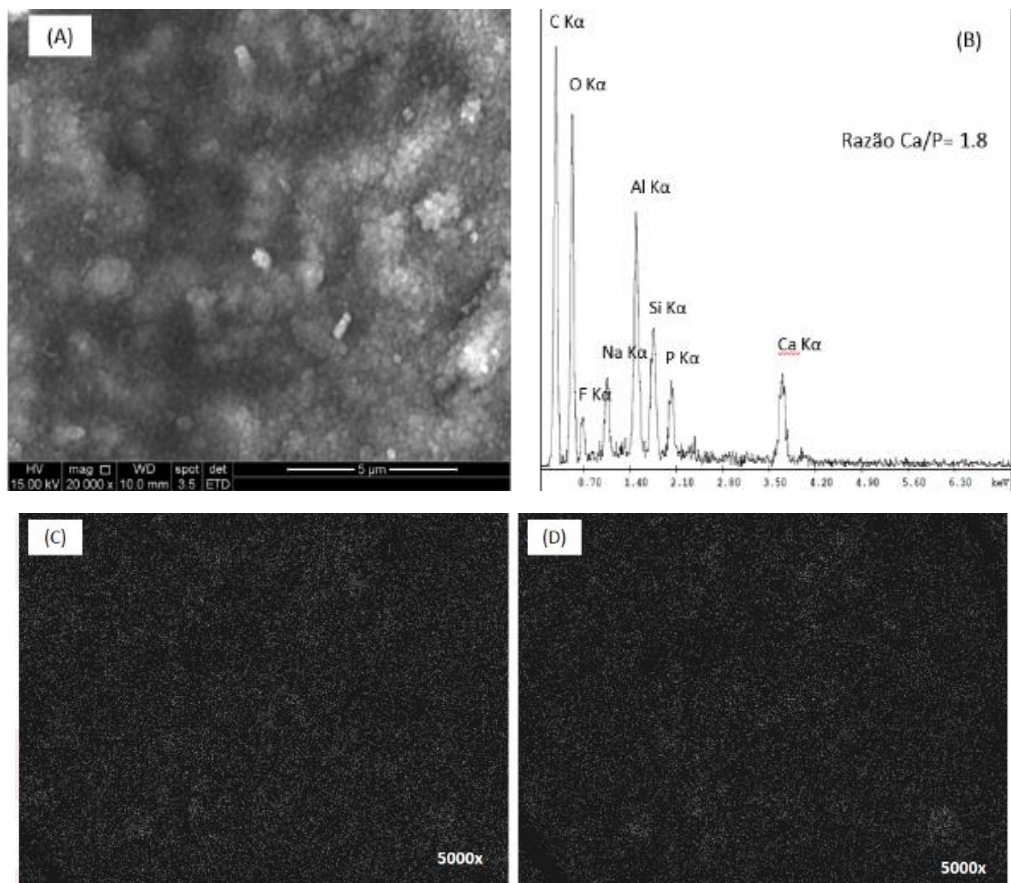


Figura 3

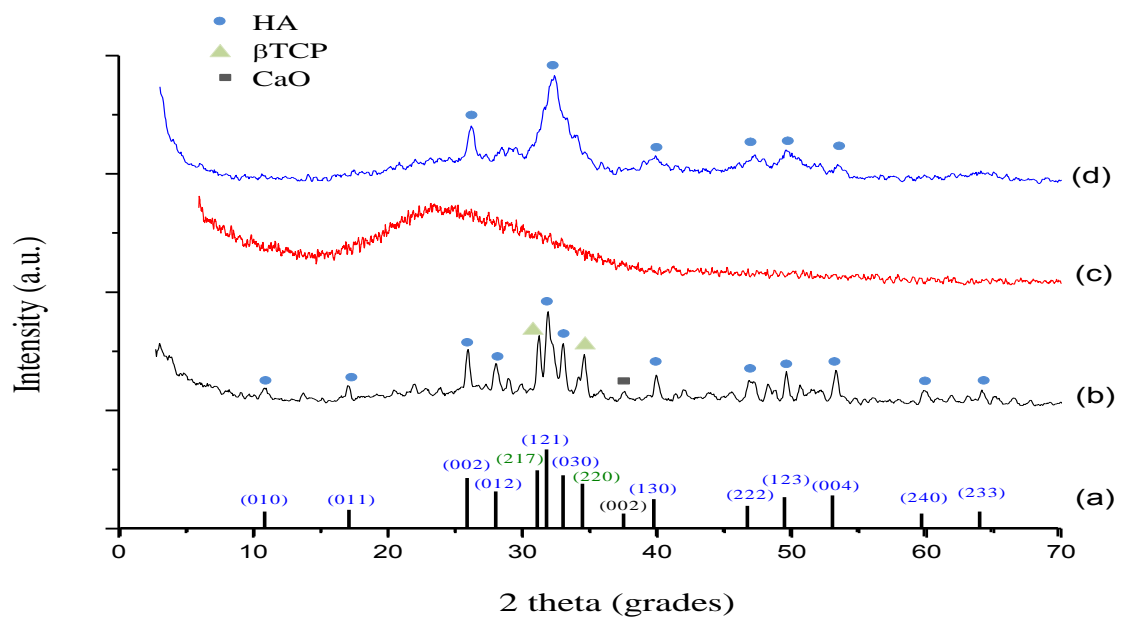


Figura 4

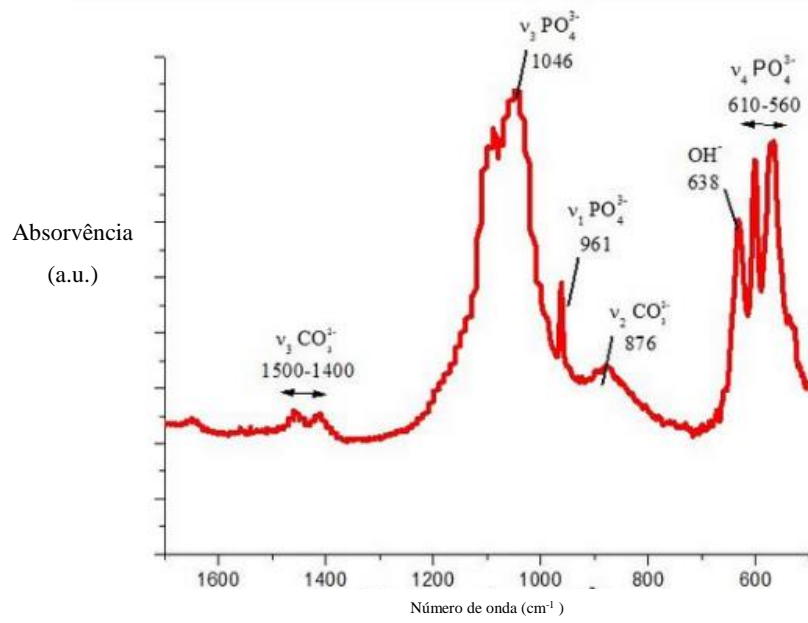


Figura 5

Tabela 1

Amostras	RC	P*	RTD	P*
CIV	21,8±6	p=0,002	24,4±7	p<0,001
CIV/nCaP	39,2±4		47,1±4	

*Teste ANOVA

Tabela 2

Amostras	Módulo de elasticidade à compressão (MPa)		Módulo de elasticidade à tração diametral (MPa)	
	Média ± SD	P*	Média ± SD	P*
CIV	(1011.9±79)	p=0.027	(524.8±37)	p=0.002
nCaP/CIV	(1057.8±23)		(812±26)	

*Teste ANOVA

APÊNDICE B – FICHA DE ACOMPANHAMENTO

Orientador: Vítor Cezar Dumont	
Aluno: Rafael Santana Mendes	
Título do TCC: Efeito da inserção de nanopartículas de fosfato de cálcio na matriz de ionômero de vidro.	
Telefone: (31)9 9568-1407	E-mail: rsmrafael360@gmail.com

Descrição de atividades/ DATA: 03/08/18

Escolha do tema, elaboração do título e início do recrutamento de artigos científicos para servir de base para a elaboração da introdução do trabalho.

Retorno marcado para o dia: 17/08/18

Visto do aluno: _____

Data do retorno: 17/08/18

Acompanhamento: Relatório da síntese de fosfato de cálcio e considerações sobre as próximas atividades, sendo a inserção das nanopartículas de fosfato de cálcio na matriz de ionômero de vidro e desenvolvimento da parte escrita.

Retorno marcado para o dia: 21/09/18

Visto do aluno: _____

Data do retorno: 21/09/18

Acompanhamento: Relatório da confecção dos corpos de prova e encaminhamento para os ensaios de resistência e caracterização, bem como a continuação do desenvolvimento da parte escrita.

Retorno marcado para o dia: 16/10/18

Visto do aluno: _____

Data do retorno: 16/10/18

Acompanhamento: Relatório dos resultados adquiridos e estruturação dos dados.

Retorno marcado para o dia: 8/11/18

Visto do aluno: _____

Data do retorno: 8/11/18

Acompanhamento: Elaboração da apresentação do pré-projeto de TCC, fechando os principais pontos.

Retorno marcado para o dia: 21/02/19

Visto do aluno: _____

Data do retorno: 21/02/19

Acompanhamento: Análise do slide do artigo base para apresentação em sala de aula.

Retorno marcado para o dia: 07/03/19

Visto do aluno: _____

Data do retorno: 07/03/19

Acompanhamento: Desenvolvimento da parte escrita e fechamento do trabalho com formatação do para as normas de submissão da Revista de Ciência e Engenharia de Materiais Dentários.

Retorno marcado para o dia: 15/05/19

Visto do aluno: _____

Data do retorno: 15/05/19

Acompanhamento: Conclusão e revisão do TCC

Visto do aluno: _____

Assinatura do Orientador

APÊNDICE C – AUTORIZAÇÃO DO ORIENTADOR PARA ENTREGA DO TCC

Eu, Vítor Cezar Dumont, orientador do(s) aluno(a) do curso de Odontologia da FACSETE, autorizo a entrega ao Coordenador do Curso, o Trabalho intitulado EFEITO DA INSERÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE CÁLCIO NA MATRIZ DO IONÔMERO DE VIDRO, para avaliação da Banca Examinadora, conforme regulamento interno desta Faculdade.

Informo, ainda, que acompanhei o TCC, conforme cronograma abaixo:

Meses	Dias de orientação		Ass. do orientador
Agosto	03	17	
Setembro	21		
Outubro	16		
Novembro	8		
Fevereiro	21		
Março	7		
Maiο	15		

Parecer do Orientador:

Assinatura do Orientador

APÊNDICE D – CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DO PROJETO

	AGO/ 2018	SET/ 2018	OUT/ 2018	NOV/ 2018	DEZ/ 2018	FEV/ 2019	MAR/ 2019	ABR/ 2019	MAI/ 2019	JUN/ 2019
Apresentação ao orientador	X									
Escolha do tema	X									
Elaboração e entrega do projeto		X								
Leitura Exploratória	X	X								
Leitura Seletiva	X	X								
Início da redação do TCC		X								
Avaliação do andamento do TCC			X	X	X		X		X	
Elaboração do TCC						X				
Digitação Provisória						X				
Conclusão e revisão do TCC								X		
Digitação das eventuais correções									X	
Entrega do TCC para avaliação da Banca Examinadora										X

APÊNDICE E – TERMO DE RESPONSABILIDADE DO ALUNO

Declaro, para os devidos fins que se fizerem necessários, que assumo total responsabilidade pelo conteúdo apresentado neste Trabalho de Conclusão de Curso, isentando a FACSETE e o Orientador de toda e qualquer representação contra o TCC, estando ciente da regulamentação institucional de TCC da Instituição.

Estou informado de que poderei responder administrativa, civil e criminalmente em caso de cópia encontrada no trabalho apresentado para correção.

Sete Lagoas/MG, 06 de junho de 2019

Rafael Santana Mendes

Manuscript Details

Manuscript number MRB_2019_1227

Title ENHANCING GLASS IONOMER CEMENT FEATURES BY USING THE CALCIUM PHOSPHATE NANOCOMPOSITE

Article type Research Paper

Abstract

This study is showed the synthesis of Glass ionomer cements (GIC) modified with calcium phosphate nanoparticles (nCaP). The nCaP/GIC were submitted to mechanical compression and diametral tensile tests, The biocomposite were characterized by scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), X-ray diffraction (XRD) and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Cytotoxicity and cell viability tests were performed on the human bone marrow mesenchymal stem cells using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)2,5-diphenyl- tetrazolium-bromide assay and LIVE/DEAD assays. Statistically significant differences were observed for mechanical properties (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$), nCaP/GIC showed higher resistance to compression and diametral traction. The SEM analyses revealed a uniform distribution nCaP in the ionomer matrix. The EDX and XRD results indicated that hydroxyapatite and calcium β -triphosphate phases. The FTIR spectra revealed the asymmetric band of $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ between 1100-1030 cm^{-1} and the vibration band associated with $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ in 963 cm^{-1} associated with nCaP. The nCaP/GIC presented response to adequate cell viability and non-cytotoxic behavior.

Keywords Ceramics; Composites; Chemical Synthesis; Electron Microscopy

Taxonomy Materials Application, Materials Characterization, Materials Processing, Materials Science Engineering, Materials Property, Applied Sciences

Manuscript category Electroceramics, structure analysis, other

Corresponding Author Vitor Dumont
Corresponding Author's FACSETE

Institution

Order of Authors Ana Caroline A. da Silva Duarte, Rafael Mendes, Rodrigo Pereira, SANDHRA MARIA DE CARVALHO, Wallison Tavares, Cintia Pimenta de Araujo, Adriana Silva, João Drumond, Vitor Dumont

Suggested reviewers Monize Carvalho, Maria Santos, Talita Martins

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Highlights.docx [Highlights]

Graphical Resume.tif [Graphical Abstract]

Manuscript.doc [Manuscript File]

Figure 1.tif [Figure]

Figure 2.tif [Figure]

Figure 3.tif [Figure]

Figure 4.tif [Figure]

Figure 5.tif [Figure]

Figure 6.tif [Figure]

Figure 7.tif [Figure]

Table.docx [Table]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

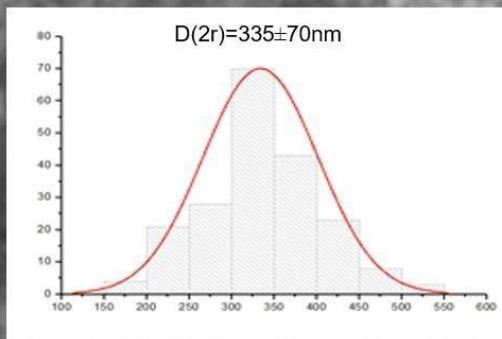
Highlights

- The nCaP have shown proven results in resistance of composites.
- The addition of the calcium β -triphosphate nanoparticles in GIC hasn't been reported.
- Glass ionomer cement with nanoparticles improved its mechanical properties.
- The restorative cement was modified with simple and low cost technique.
- The composite showed interaction between nanoparticles and ionomer matrix.

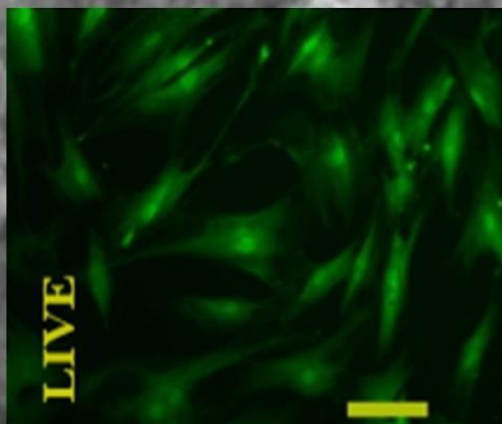
nCaP/GIC

nCaP

Frequency (%)



Diameter (2r)



HV 15.00 kV mag 20 000 x WD 10.0 mm spot 3.5 det ETD

1ENHANCING GLASS IONOMER CEMENT FEATURES BY USING THE CALCIUM

2PHOSPHATE NANOCOMPOSITE

Ana Caroline A. Duarte ^(a), Rafael S. Mendes ^(b), Rodrigo D. F. C. Pereira ^(a), Sandhra M. Carvalho ^(c), Cintia

4T. P. de Araújo ^(a), Adriana G. da Silva ^(b), Wallison D. T. Oliveira ^(a), João Paulo S. C. Drumond ^(b),

Vitor C. Dumont ^(a,b,c*)

5

6 *^a Federal University of the Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, Diamantina-MG*

7 *^b Faculty of Dentistry of Sete Lagoas –FACSETE, Sete Lagoas-MG*

8 *^c Federal University of Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte-MG*

9

10* Corresponding author at: Faculty of Dentistry of Sete Lagoas – FACSETE, Rua da Itália Pontelo, 50/86,

11Sete Lagoas/MG, CEP 35700-170, Brazil. Tel.: +55 31 37733268.

12E-mail address: vitorcdumont@gmail.com

13

141. Introduction

15Glass ionomer cements (GIC) have become a prominent material in dentistry being widely used for

16aggregating satisfactory physical and biological properties. Adhesion to tooth structure characterized by the

17chemical interaction of carboxyl groups of polyacids to calcium ions of dental tissues, low contraction and

18expansion during prey reaction and thermal expansion coefficient similar to that of tooth structure minimize

19microleakage at the tooth / restoration interface [1-4]. Its anti-cytogenetic nature associated with

20biocompatibility and fluoride release act on the remineralization of dental tissues and on the control of caries

21recurrence, discarding the need for total removal of infected and softened dentin to control the progression of

22dental caries [2-5].

23The use of GIC as a direct restorative material presents some limitations associated with its low mechanical

24resistance (abrasion and flexural), friability, high modulus of elasticity and deterioration in acidic pH, being

25 therefore fragile and prone to fracture [2,3,6].

26 Modifications of the glass ionomer cements with metals, polymers and ceramics in different metric scales

27 have been proposed with the aim of improving the mechanical and biological properties [3,4,7-12]

28 In this context, the use of calcium phosphate (CaP) biomaterials are of particular interest in improving

29 mechanical properties, incorporating topographic features at the nanoscale that mimic the natural tooth

30 nanostructure and establishing an intimate and functional relationship with adjacent tissue [13-18]. The

31 amount of calcium phosphate incorporated requires compatibility between the nanoparticles and the polymer

32 matrix, significantly influencing the wettability and viscosity of the composite [19].

33 Numerous studies with calcium phosphate particles added to composites demonstrated improvements in

34 mechanical properties [1,3-12,19,20]. However, no study has been reported in the literature involving the

35 hydroxyapatite and β -TCP phases of calcium phosphate in the modification of glass ionomer cement for the

36 improvement of mechanical properties and decrease of cytotoxicity.

37 This study is reported to biocomposites synthesis based on arrays of glass ionomer cement (GIC) modified

38 with calcium phosphate nanoparticles (nCaP). The biocomposites were characterized by scanning electron

39 microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), X-ray diffraction (XRD) and Fourier

40 transform infrared spectroscopy (FTIR). Cytotoxicity and cell viability tests were performed on the human

41 bone marrow mesenchymal stem cells (HBMSC) using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl

42 tetrazolium bromide (MTT) assay and LIVE/DEAD assays.

43

44 2. Experimental procedure

45 2.1 Materials

46 All of the reagents and precursors, phosphoric acid (Sigma-Aldrich, USA, 85%, H_3PO_4), calcium hydroxide

47 (Sigma-Aldrich, USA, $\geq 96\%$, $Ca(OH)_2$) and ammonium hydroxide (Synth, Brazil, 30%, NH_4OH) were used

48 as received. Ionomer glass cement (GIC) (FGM, Brazil, Maxxion R) was modified. Deionized water

49(Millipore Simplicity™) with a resistivity of 18MΩ cm was used in the preparation of all solutions.

50Potassium bromide (Sigma-Aldrich, USA, ≥99%, KBr), suitable for spectroscopy, was used to prepare the
51FTIR pellets.

52

532.2 Synthesis of calcium phosphate nanoparticles (nCaP)

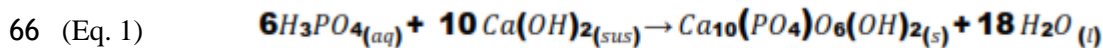
54The nCaP particles were synthesized by aqueous precipitation route, at (25±2)°C (Figure 1) [21]. The

55precursors were prepared as follows: 0.6ml of H₃PO₄ was slowly added to 89.4ml of deionized water under
56magnetic stirring for 15min. This phosphate precursor solution was referred to as "SOL_1".

57Approximately 1.1g of Ca(OH)₂ powder was added to 10mL of deionized water and under vigorous stirring
58for 15min. This calcium suspension was referred to as "SUS_1". Then "SUS_1" was added slowly to
59"SOL_1" for the synthesis reaction and this mixture ("SUS_2") was magnetically stirred for 1h.

60Subsequently, SUS_2 was allowed to stand for 24h at (25±2)°C. The supernatant was decanted from the
61solid material. The precipitate was vacuum filtered using custom filter paper on a Büchner funnel, 3 washes
62were performed with deionized water and filtered again. The material retained was subjected to drying at a
63temperature of (25±2)°C for 96h. The chemical reaction of the formation of calcium phosphate is represented
64in the equation 1:

65



67

682.3 Biocomposite synthesis (nCaP/GIC)

69The nCaP/GIC was obtained by the addition of 1.1g of nCaP which were weighed and added to 10g powder
70of the GIC. The agglutination of the material followed the standards required by the manufacturer in room
71temperature (25±2)°C.

72

732.4 Mechanical tests

74 Test specimens (cps) (n = 20) of GIC and nCaP/GIC were made in a teflon matrix with 4mm in diameter and
75 8mm in length, resting on a glass plate. The cement was inserted into the matrix under pressure through a
76 specific syringe (Centrix, DFL Ind., São Paulo, SP, Brazil) to minimize the formation of bubbles in the
77 cement body. After complete filling of the matrix, a polyester strip was pressed on the surface of the cement
78 under a weight of 500g until reaching its setting time in order to obtain adequate flow and surface
79 smoothness of the material. After 24h of storage in distilled water, at (37±1)°C, cps (n = 10) of G1-GIC and
80 G2- nCaP/GIC were subjected to the compressive strength test in a universal test machine EZ Test
81 (Shimadzu, Japan) with a load cell of 200kgf at a speed of 1mm/min, with its long axis in the vertical
82 position, until its fracture. For the diametral tensile strength test, cps (n = 10) were submitted to the same
83 load cell, but with a velocity of 0.5mm/min and with its long axis in the horizontal position.

84 The results were submitted to the normality test (Shapiro-Wilk), then a parametric statistical test (ANOVA)
85 was applied to verify differences between the groups using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS
86 for Windows, version 17.0, SPSS Inc., USA). Statistical analysis of the data was performed with a level of
87 significance of 95%.

88

89 2.5 Characterizations of the biocomposite (nCAP/GIC) and precursors

90 2.5.1 Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersion X-ray spectroscopy analysis (EDX).

91 The morphologies glass ionomer cement (GIC) modified with calcium phosphate nanoparticle (nCaP) were
92 evaluated using a scanning electron microscope (SEM, FEI-INSPECTTM S50) coupled with energy
93 dispersion X-ray spectroscopy (EDX, EDAX GENESIS). Before examination, the samples were coated with
94 a thin carbon film via sputtering using a low deposition rate, cooling the substrate, and ensuring the
95 maximum distance between the target and the sample to avoid sample damage. Images of secondary
96 electrons (SE) were obtained using an accelerating voltage of 15kV.

97 The nCaP particles sizes and size distribution data were obtained based on the SEM images by measuring at

98least 100 randomly selected nanoparticles using an image processing program (ImageJ, public domain
99software, version 1.44, National Institutes of Health).

100

1012.5.2 X-ray diffraction (XRD)

102The crystallinity of the phases presents in the biocomposites (nCaP/GIC) was assessed based on the X-ray
103diffraction (XRD) patterns recorded using a PANalytical X'Pert diffractometer (Cu-K α radiation with
104 $\lambda=1.5406\text{\AA}$). Measurements were performed in the 2θ range of 15° to 75° with steps of 0.06° .

105

1062.5.3 Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR)

107Fourier transform infrared (FTIR) was performed in the range of 650 to 4000cm^{-1} (Fischer Thermo Nicolet
1086700) using the transmission mode. The nCaP and nCaP/GIC were placed in a sample holder and scanned
109immediately (16 scans) with a resolution of 2cm^{-1} background subtraction

110

1112.6 Cytotoxicity assay

112Culture of cells.

113Human bone marrow mesenchymal stem cells

114The Human bone marrow mesenchymal stem cells (HBMSC) were kindly Prof^a: Maria de Fátima Leite of
115department of physiology and biophysics, UFMG. The cells were cultured in Dulbecco's modified eagle
116medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS) penicillin G sodium (10units.mL^{-1}), streptomycin
117sulfate (10mg.mL^{-1}) and amphotericin-b (0.025mg.mL^{-1}) all from Gibco BRL (NY, USA) in a humidified
118atmosphere of 5% CO_2 at $(37\pm 1)^\circ\text{C}$. The cells were used for experiments on passage 5. Toxicity assay by
119resazurin and MTT: All biological tests were conducted according to ISO standards 10993-5:1999
120(Biological evaluation of medical devices; Part 5: tests for in vitro cytotoxicity and Part 12-7; Sample
121preparation of extracts of test materials)

122

1232.6.1 (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) MTT assay

124HBMSC cells were plated (3×10^4 cells/well) in 96-well plates. Cell populations were synchronized in
125serum-free media for 24h. After this period, the medium was aspirated and replaced with medium containing
12610% FBS. Samples of GIC and nCaP/GIC ($5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were added to individual wells. Controls were used
127with the cells and DMEM with 10% FBS, the positive control Triton x-100 (1% v/v in phosphate buffered
128saline, PBS, Gibco BRL, NY, USA) and, as a negative control, chips of sterile polypropylene Eppendorf
129tubes ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Eppendorf, Hamburg, Germany). After 72h, the medium was aspirated and replaced with
13060 μL of culture medium with serum in each well. Next, 50 μL of MTT medium ($5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich,
131MO, USA) was added to each well and was incubated for 4h in an oven at $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ and 5% CO_2 .
132Subsequently, 40 μL of the SDS solution/4% HCL was placed in each well and incubated for 16h in an oven
133at $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ and 5% CO_2 . Then, 100 μL was removed from each well and transferred to a 96-well plate to
134quantify the absorbance (Abs) using Varioskan Reader (Thermo Scientific) with a 595-nm filter. The values
135obtained were expressed as percentage of viable cells according to the following formula: Cell viability (%)
136= (absorbance samples and cells x 100) / absorbance (control). Assume the values of controls (wells with
137cells, and no samples) as 100% cell viability.
138Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for data analysis. Statistical
139significance was tested using One-way ANOVA followed by Bonferroni test. A p value < 0.05 was
140considered statistically significant. Experiments were performed with $n = 3$.

141

1422.6.2 Live / dead assay

143HBMSC cells were plated (3×10^4 cells/well) in 96-well plates. Cell populations were synchronized in
144serum-free media for 24h. After this period, the medium was aspirated and replaced with medium containing
14510% FBS. Samples of GIC and nCaP/GIC ($5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were added to individual wells. After 72h, all media

146 was aspirated, washed with PBS for two times with 10mL of phosphate buffered saline (PBS) from (Gibco
147 BRL, NY, USA). The HBMSC cells were treated for 30min with the kit LIVE / DEAD Viability /
148 citotoxicity from (Life Technologies of Brazil Ltda, São Paulo) according to manufacturer's specifications.
149 Images were obtained with a inverted optical microscope (Nikon, Japan,), the fluorescence emissions
150 should be acquired separately as well, calcein at $530 \pm 12.5\text{nm}$, and EthD-1 at $645 \pm 20\text{nm}$.

151

1523. Results and discussion

1533.1 Mechanical tests

154 There was a statistically significant difference between GIC and nCaP/GIC for the compressive strength test
155 and the diametral tensile strength test (table 1).

156 The results of the nCaP/GIC in the mechanical assays may be associated with a strong influence of the
157 increase of the calcium concentration in the prey steps of the material. In the initial stage during the
158 agglutination of the powder and liquid, the hydrogen promotes the displacement of calcium and aluminum
159 ions that react with the fluoride forming calcium and aluminum fluorides. As the pH of the system decreases
160 the dissociation of these fluorides occurs which react with the copolymers forming more stable complexes. It
161 is suggested that the increase in calcium concentration by the incorporation of nCaP displaces the chemical
162 reaction a favor of the formation of these more stable compounds.

163 Another step that can be influenced by the incorporation of nCaP is the formation phase of the polyacid
164 matrix. At this stage, the release of calcium occurs with greater velocity due to its cationic character
165 interacting with the aqueous chains of polyacids forming crosslinks, forming the gel matrix allowing

166hardening of the material. Thus, the high concentration of calcium can accelerate the prey of the material
167minimizing the influence of the medium, sinerese and imbibition, predisposing the nCaP/GIC to present
168better results in the mechanical tests.

169

1703.2 Characterizations of the biocomposite (nCAP/GIC) and precursors

171 3.2.1 Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersion X-ray spectroscopy analysis (EDX).

172Morphological evaluations of nCaP show considerable heterogeneity in the form of the synthesized particles
173(Figure 2(a)). The characteristic EDX spectra are shown in Figure 2(b) showing peaks associated with Ca
174and P elements, and a Ca / P ratio equal to 1.8, suggesting the precipitation of the hydroxyapatite phase. The
175synthesis process allowed the formation of particles in the gauge scale (Figure 2(c)).

176The modification of the GIC allowed the synthesis of homogeneous biocomposites with greater surface
177roughness (Figure 3(a)). The EDX spectra showed peaks of Ca and P elements attributed to nCaP as shown
178in Figure 3(b). In addition, the Ca-K α mapping analyzes revealed that the particles of nCaP are uniformly
179dispersed in the composite matrix without detecting any segregation (Figures 3(c) and 3(d)).

180

1813.2.2 X-ray diffraction (XRD)

182The standard calcium phosphate (nCaP) XRD, GIC and nCaP/GIC are shown in figure 4. The figure 4(a)
183showed characteristic peaks of calcium phosphate particles (International Centre for Diffraction Data,
184JCPDS 86-1203). The XRD spectra of nCaP (Figure 4(b)) showed major peaks characteristic of HA in 2
185theta equal to 31,7° (2 1 1) 32,8° (3 0 0) 32,2° (1 1 2), and 25,9° (0 0 2) , and other smaller peaks with
186intensities associated β - tricalcium phosphate (β -TCP) phase (28.0°, 31.2°, and 34.5°). The XRD spectra of
187nCaP/GIC (Figure 4(c)) showed of the halo characteristic of polymers with amorphous appearance. X-ray
188diffraction also certifies that the GIC overlaps the characteristic peaks of β -TCP, evidencing only the peaks
189associated with hydroxyapatite (Figure 4(d)).

1913.2.3 Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR)

192The figure 5 show the spectra of nCaP/GIC. The FTIR results shown the asymmetric band of ν_3 PO_4^{3-}
193between $1100\text{-}1030\text{cm}^{-1}$ and the vibration band associated with ν_1 PO_4^{3-} in 963cm^{-1} associated with the

194phases of calcium phosphate.

195

1963.3 Cytotoxicity assay

197In the current study the viability of HBMSC cells in direct contact with GIC and nCaP/GIC samples were
198analyzed by MTT assay. This test is specifically used to evaluate mitochondrial function and cell viability.
199When analyzing the behavior of HBMSC cells in contact with the GIC sample showed no significant
200difference in viability when compared to the control group. However, when analyzing the cells in contact
201with the nCaP/GIC sample there was a significant increase in viability of $12.00 \pm 6.50\%$ when compared to
202the control group. Moreover, when we compare the behavior of HBMSC cells in contact with the two
203biomaterials observed significant difference of 22.00% in nCaP/GIC sample compared to GIV sample
204(Figure 6).

205The results shown in Figure 7 confirm the biocompatibility of the biomaterials developed. It can be seen that
206the HBMSC cells in contact with both samples showed similar patterns of fluorescence when compared to
207the untreated control group, ie, high green fluorescence (viable cells) and little or no red fluorescence (dead
208cells). The similarity of the fluorescence is more evident in cells in contact with the nCaP/GIC sample.

209

2104. Conclusion

211This study demonstrates for the first time that the incorporation of nanoparticles of calcium phosphate,
212hydroxyapatite and BTCP in nanometric scale affect the GIC prey phases. The results showed that nCaP was
213evenly distributed in the ionomer matrix, and provided improvements in the mechanical properties of the
214material. Regarding cytocompatibility in vitro, no toxicity was observed for any of the groups tested. The
215nCaP/GIC biocomposites are more promising for potential application in dentistry by favoring the repair and
216replacement of bone tissue in vivo assays.

217

218 Acknowledgments

219 The authors acknowledge the financial support from CAPES, FAPEMIG and CNPq.

220

2215. References

222 [1] RM Silva, FV Pereira, FA Mota, E Watanabe, SM Soares, MH Santos. Dental glass ionomer cement

223 reinforced by cellulose microfibers and cellulose nanocrystals, *Materials Science and Engineering C* 58

224 (2016) 389–395. doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.041

225 [2] S Gurgan, ZB Kutuk, E Ergin, SS Oztas, and FY Cakir. Four-year Randomized Clinical Trial to Evaluate

226 the Clinical Performance of a Glass Ionomer Restorative System, *Operative Dentistry*: March/April (2015)

227 134-143. doi.org/10.2341/13-239-C

228 [3] JCM Souza, JB Silva, A Aladim, O Carvalho, RM Nascimento, FS Silva, AE Martinelli, B Henriques.

229 Effect of Zirconia and Alumina Fillers on the Microstructure and Mechanical Strength of Dental Glass

230 Ionomer Cements, *Open Dent J.* (2016) 10:58-68. doi: 10.2174/1874210601610010058.

231 [4] K Gorseta, D Glavina, Thermo-cured glass ionomer cements in restorative dentistry, *J Istanb Univ Fac*

232 *Dent.* (2017) s122-S127. doi: 10.17096/jiufd.10280.

233 [5] RM Silva, FV Pereira, MH Santos, JA Soares, SMCS Soares, JL de Miranda. Biocompatibility of a New

234 Dental Glass Ionomer Cement with Cellulose Microfibers and Cellulose Nanocrystals, *Brazilian Dental*

235 *Journal* (2017) 172-178. doi.org/10.1590/0103-6440201701059

236 [6] MS Baig, GJ Fleming. Conventional glass ionomer materials: A review of the developments in glass

237 powder, polyacid liquid and the strategies of reinforcement, *J Dent.* (2015) 897-912. doi:

238 10.1016/j.jdent.2015.04.004.

239 [7] A Valanezhad, T Odatsu, K Udoh, T Shiraishi, T Sawase, I Watanabe. Modification of resin

240 modified glass ionomer cement by addition of bioactive glass nanoparticles, *J Mater Sci Mater Med.* (2016).

241 doi: 10.1007/s10856-015-5614-0.

242[8] K Tolidis, C Boutsiouki, P Gerasimou. Comparative evaluation of microleakage of a
243carbomer/fluoroapatite-enhanced glass-ionomer cement on primary teeth restorations, Eur J Paediatr
244 Dent. (2016) 227-233.

245[9] MA Ibrahim, J Neo, RJ Esquerre, AS Fawzy. Characterization of antibacterial and adhesion properties of
246chitosan-modified glass ionomer cement, J Biomater Appl. (2015) 409-19. doi: 10.1177/0885328215589672.

247[10] J Sangsuwan, S Wanichpakorn, U Kedjarune-Leggat. Translationally controlled tumor protein
248supplemented chitosan modified glass ionomer cement promotes osteoblast proliferation and function, Mater
249 SciEng C Mater Biol Appl. (2015) 61-8. doi: 10.1016/j.msec.2015.04.036.

250[11] P Subramaniam, KL Girish Babu, L Neeraja, S Pillai. Does Addition of Propolis to Glass Ionomer
251Cement Alter its Physicomechanical Properties? An In Vitro Study, J ClinPediatr Dent. (2017) 62-65. doi:
25210.17796/1053-4628-41.1.62.

253[12] SN Lima, AC Venção, MC Kuga, MG Magro, AM Guiotti, JC Segalla, KC Jordão-Basso, WA Ricci,
254 MR Tonetto, MC Bandéca. Effect of Carbamide Peroxide on the Push-out Bond Strength of Different
255Composition Glass-Ionomer Cement to Root Canal Dentin when used as Cervical Barrier, J Contemp Dent
256 Pract. (2015) 944-9.

257[13] R Masaeli, TS Jafarzadeh Kashi, R Dinarvand, V Rakhshan, H Shahoon, B Hooshmand, F Mashhadi
258 Abbas, M Raz, A Rajabnejad, H Eslami, K Khoshroo, M Tahriri, L Tayebi. Efficacy of the biomaterials
2593wt%-nanostrontium-hydroxyapatite-enhanced calcium phosphate cement (nanoSr-CPC) and nanoSr-CPC-
260incorporated simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic-acid) microspheres in osteogenesis improvement: An
261explorative multi-phase experimental in vitro/vivo study, Mater SciEng C Mater Biol Appl. (2016) 171-83.
262doi: 10.1016/j.msec.2016.06.033.

263[14] MAS Melo, MD Weir, VF Passos, M Poderes, HHK Xu. Ph-activated nano-
264amorphous calcium phosphate-based cement to reduce dental enamel demineralization, Artif Cells
265 NanomedBiotechnol. (2017) 1778-1785. doi: 10.1080/21691401.2017.1290644.

266[15] M Ekambaram, SNB Mohd disse, CKY Yiu. Review of Enamel Remineralisation Potential of Calcium-
267and Phosphate-based Remineralisation Systems, Oral Health Prev Dent. (2017) 415-420. doi:
26810.3290/j.ohpd.a38779.

269[16] XJ Xie, D Xing, W Lin, H Zhou, MD Weir, YX Bai, HHK Xu. Novel rechargeable calcium phosphate
270nanoparticle-containing orthodontic cement, Int J Oral Sci.(2017) 24-32. doi: 10.1038 / ijos.2016.40.

271[17] L He, D Deng, X Zhou, L Cheng, JM dez Cate, J Li, X Li, W Crielaard. Novel tea polyphenol-
272modified calcium phosphate nanoparticle and its remineralization potential, J Biomed Mater Res B
273 ApplBiomater. (2015) 1525-31. doi: 10.1002/jbm.b.33333.

274[18] L Zhang, DW Michael, H Gary, FF Ashraf, HKX Hockin. Rechargeable dental adhesive
275with calcium phosphate nanoparticles for long-term ion release, J Dent. (2015) 1587-95. doi:
27610.1016/j.jdent.2015.06.009.

277[19] RM Silva, VXM de Carvalho, VC Dumont, MH Santos, AMML Carvalho. Addition of mechanically
278processed cellulosic fibers to ionomer cement: mechanical properties, Braz Oral Res [online] (2015) 1-8. doi:
279 10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0030

280[20] S Mickenautsch. High-viscosity glass-ionomer cements for direct posterior tooth restorations in
281permanent teeth: The evidence in brief, J Dent. (2016) 121-123. doi: 10.1016/j.jdent.2016.10.007.

282[21] VC Dumont, AAP Mansur, SM Carvalho, FGL Medeiros Borsagli, MM Pereira, HS Mansur.
283Chitosan and carboxymethyl-chitosan capping ligands: Effects on the nucleation and growth of
284hydroxyapatite nanoparticles for producing biocomposite membranes, Mater Sci Eng C Mater Biol
285 Appl. (2016) 265-277. doi: 10.1016/j.msec.2015.10.018.

286

287FIGURE CAPTIONS

288Figure 1 – Synthesis of calcium phosphate nanoparticles (nCaP).

289Figure 2 – Morphological analysis of nCaP ((A) SEM image). Chemical analysis: EDS spectra (B) and

290 histogram of the mean size of nCaP (C).

291 Figure 3 – Morphological analysis of nCaP/GIC ((A) SEM image). Chemical analysis: EDS spectra (B) and

292 mapping of Ca K α (C) and P K α (D) elements.

293 Figure 4 – XRD spectra of the reference CaP (ICDD-96-900-3549) (A), nCaP (B), GIC (C) and nCaP/GIC

294 (D).

295 Figure 5 – FTIR spectra of the nCaP.

296 Figure 6 - MTT assay after 24h incubation direct contact with mesenchymal stem cells from bone marrow.

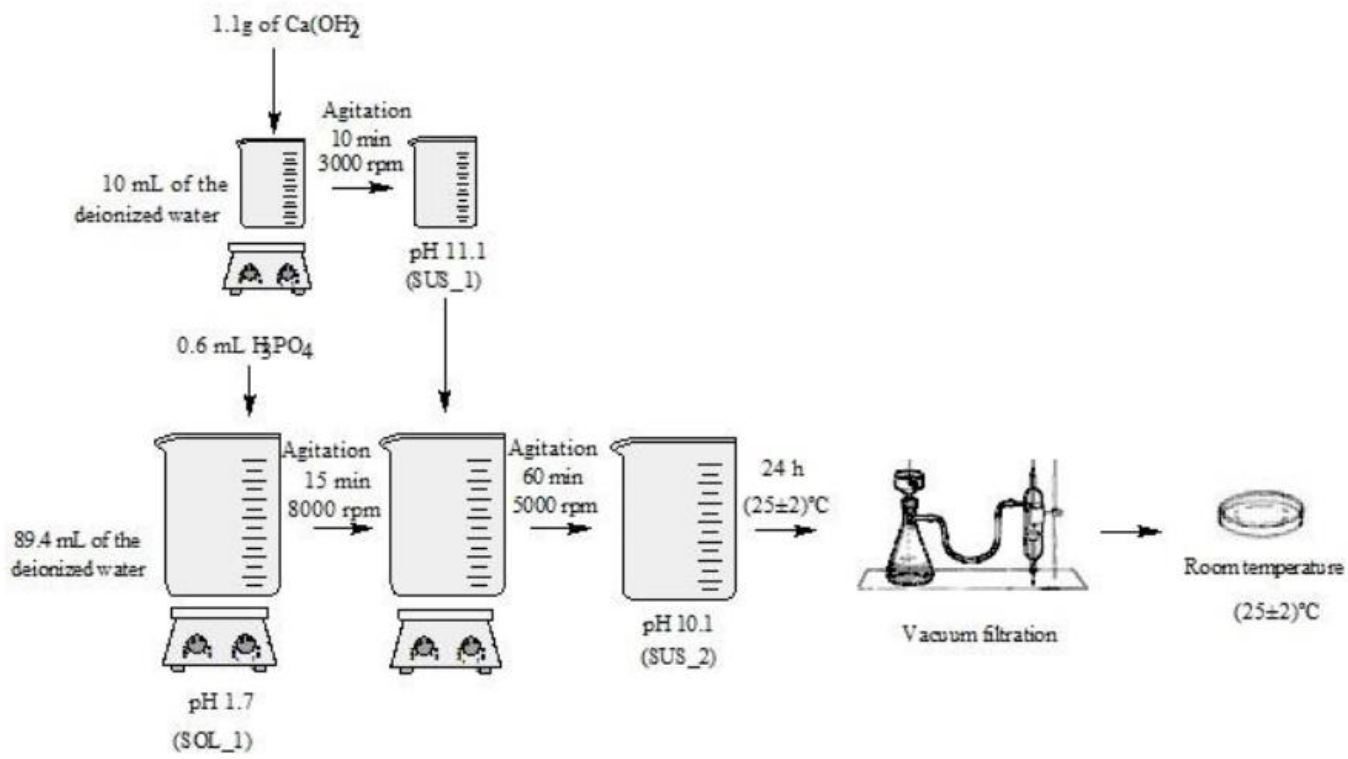
297 Figure 7 - Live/Dead assay with HBM cells after 72h of direct contact. In the control, in the GIC and

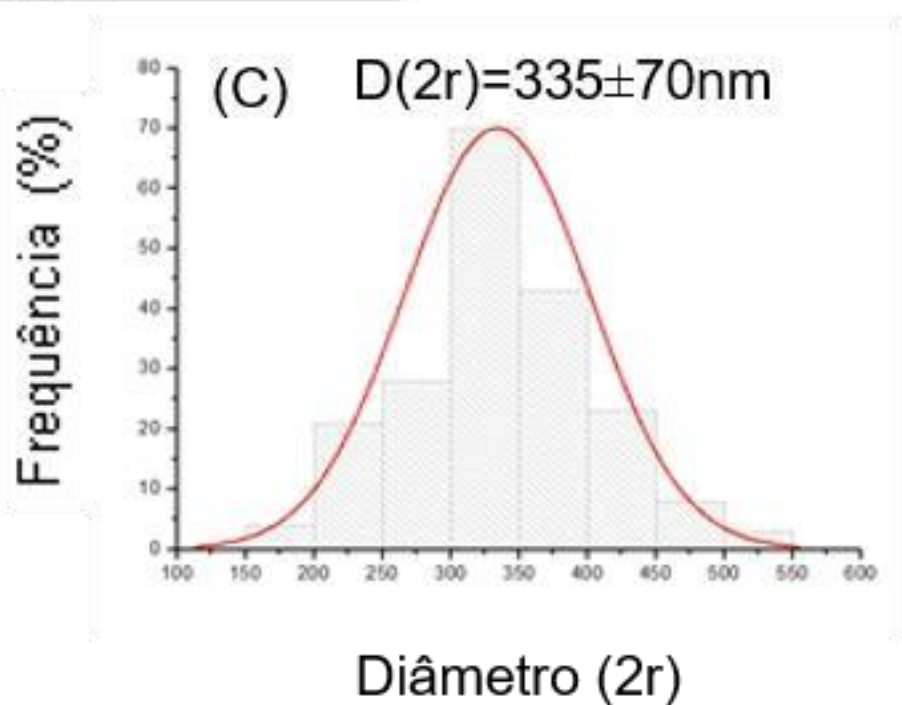
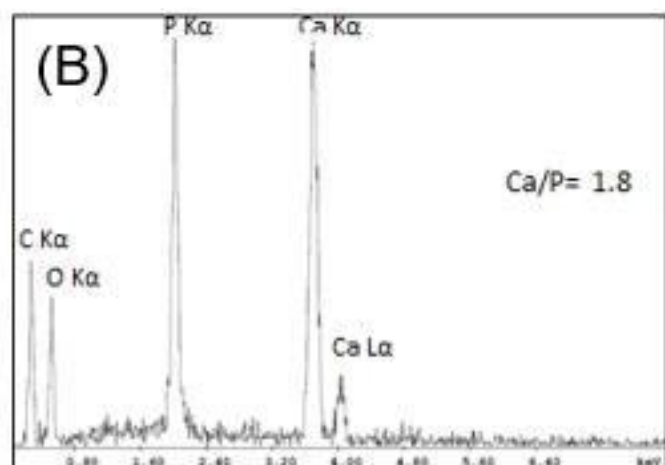
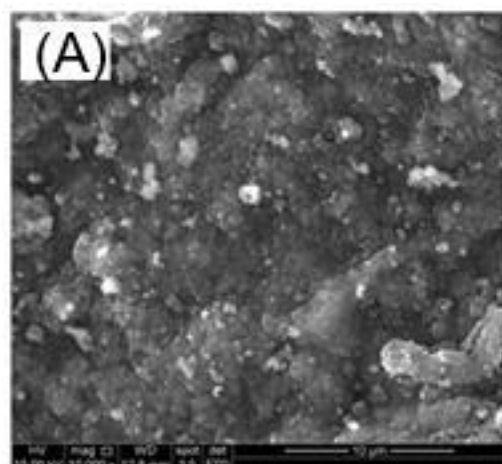
298 nCaP/GIC samples (bar = 100 μ m, 200x), live cells ((A), green) and dead cells ((B), red).

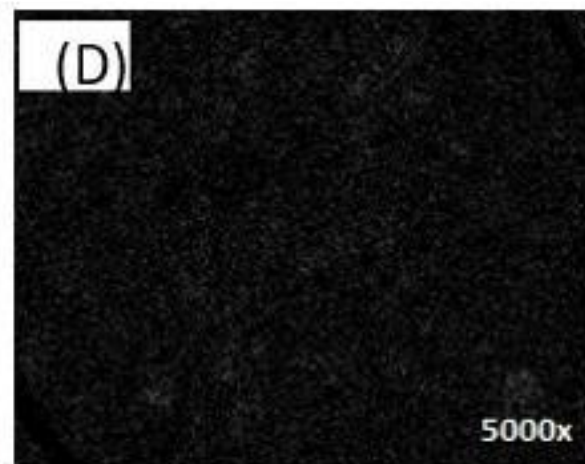
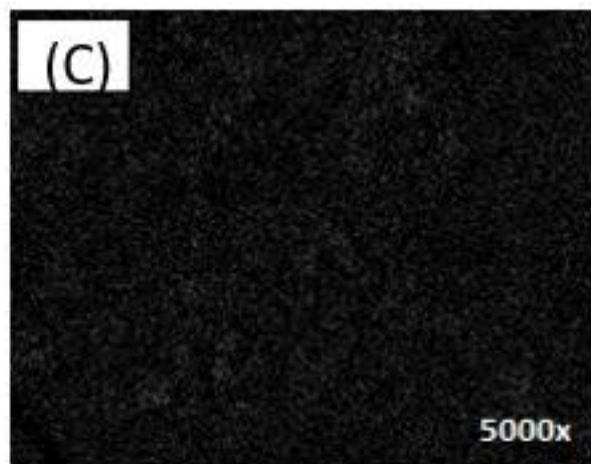
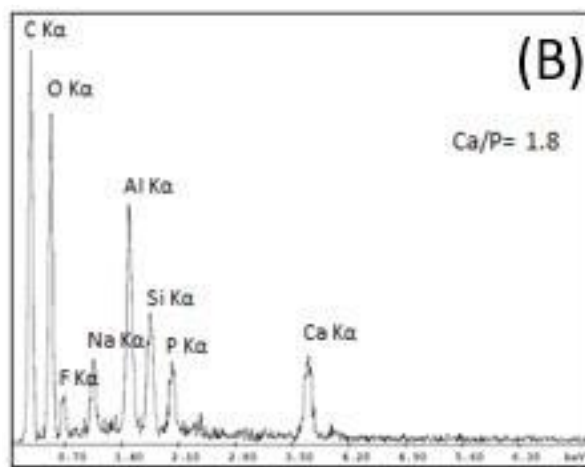
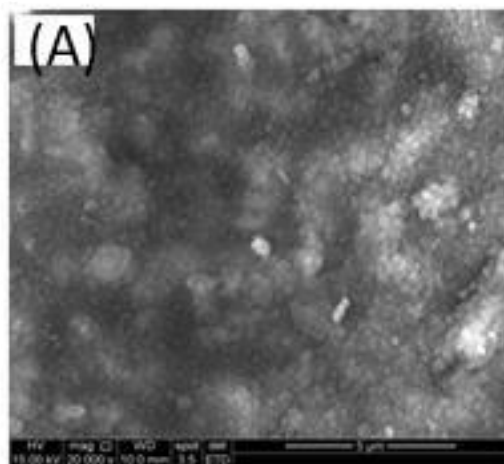
299

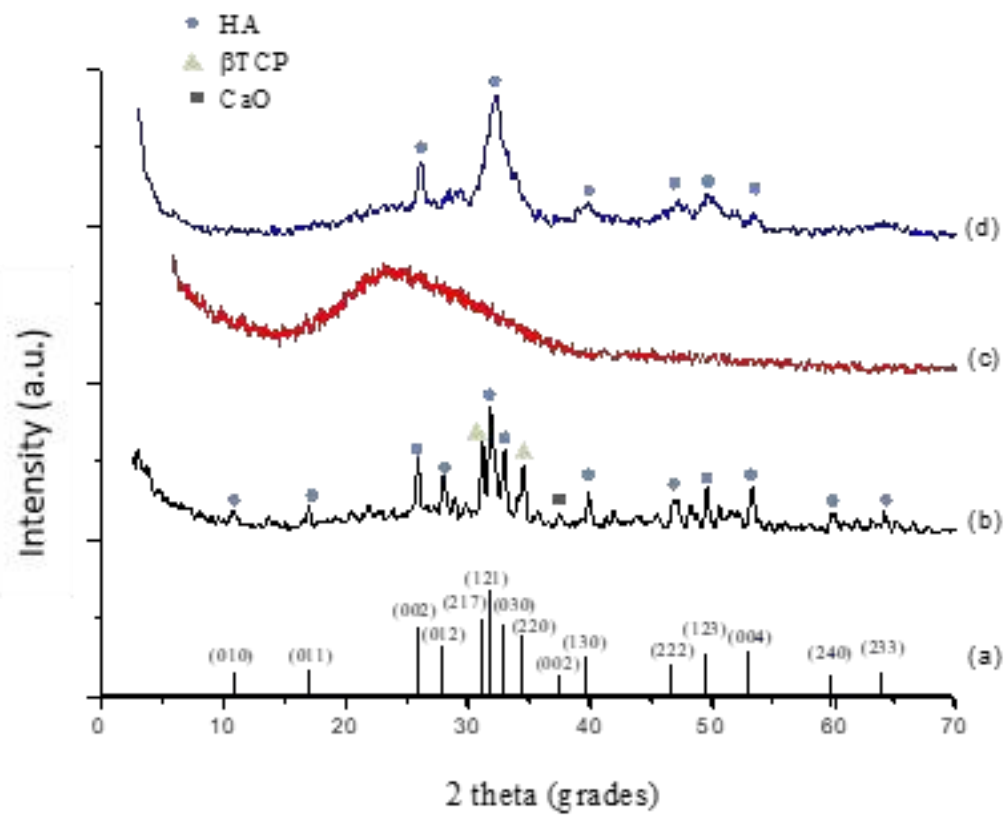
300 TABLES CAPTIONS

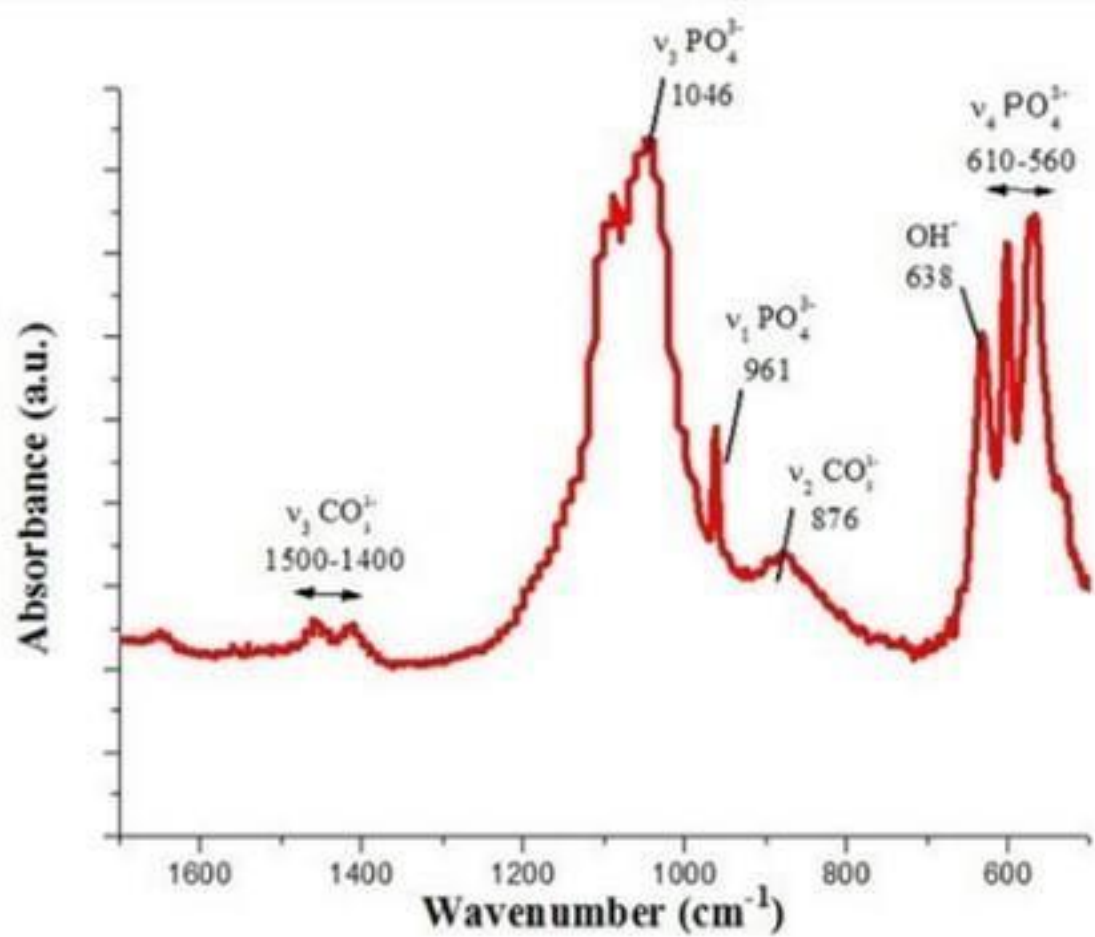
301 Table 1 - Mean values (MPa) of the compressive strength (CS) and diametral tensile strength (DTS).



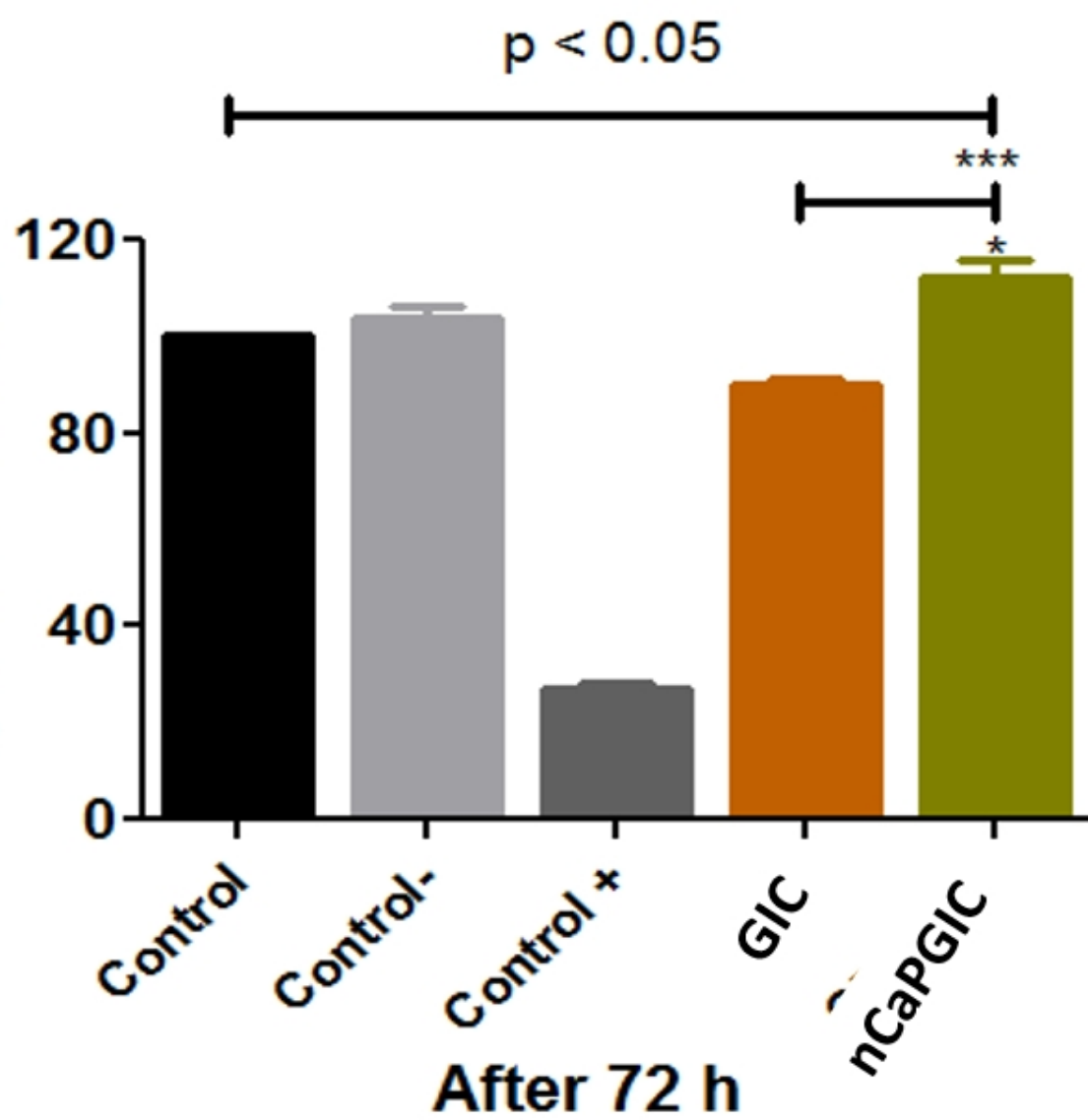








**HBMSC Cell viability
(% of control)**



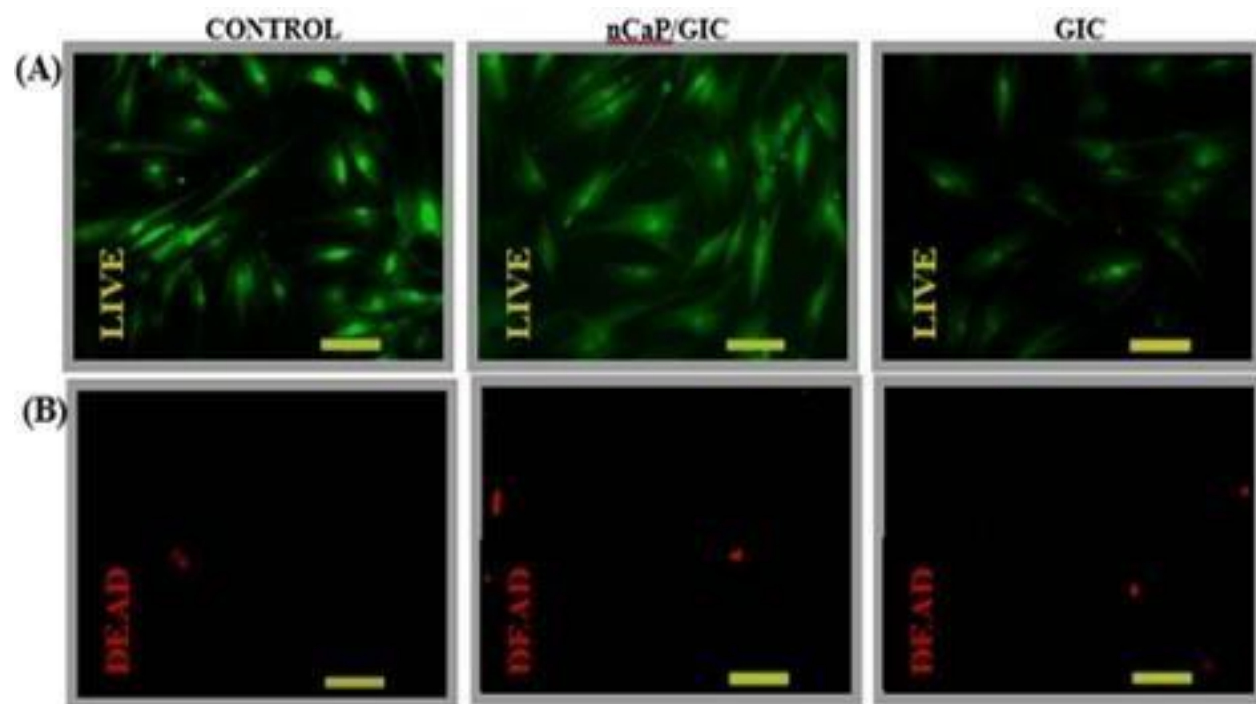


Table 1

Specimens	CS	<i>P</i> *	DTS	<i>P</i> *
GIC	21,8± 6	p=0,00	24,4± 7	p<0,00
nCaP/GI C	39,2± 4	2	47,1± 4	1

*Anova assay