



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI



FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

**BIOMATERIALE AVANSATE BAZATE PE PULBERI
ANORGANICE BIOACTIVE ȘI MATRICI POLIMERICE
NATURALE SAU SINTETICE CU APLICAȚII IN MEDICINA**

DOCTORAND: Ioana-Maria Hodișan (căs. Ambrosie)

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC: Prof. Univ. Dr. Maria Tomoaia-Cotișel

Cluj-Napoca

2018

CUVINTE CHEIE: GIOMER, STICLĂ PREREAȚIONATĂ, UMPLUTURĂ
ANORGANIICĂ, MATRICI POLIMERICE, ADEZIUNE,
SISTEME ADEZIVE, TERMOGRAFIA DE DETECȚIE
SINCRONĂ, AFM, SEM, BIOCUMPATIBILITATE

Contents

Capitol 1. Biomateriale avansate cu utilizare în medicină	5
1.1 Biomateriale de restaurare, regenerare și remineralizare țesuturilor dentare.....	5
1.1.1 Matrici polimerice naturale și sintetice	5
1.1.2. Pulberi anorganice	6
1.2. Sisteme adezive cu aplicații în stomatologie	7
1.2.1. Compoziția sistemelor adezive	7
1.2.2. Clasificarea sistemelor adezive	7
1.3. Giomeri.....	8
1.3.1. Istoric	8
1.3.2. Compoziție, proprietăți și aplicații.....	8
Capitol 2. Biomateriale inteligente de tip giomer.....	9
2.1. Modele experimentale pentru umpluturile hibride utilizate în giomeri	9
2.2. Modele experimentale pentru matricea organică utilizată în giomeri.....	10
2.3. Prepararea și caracterizarea structurală a giomerilor de restaurare și a giomerilor de sigilare	11
Capitol 3. Testarea noilor biomaterialelor avansate de tip giomer	13
3.1. Determinarea gradului de conversie	13
3.2. Determinarea absorbției și solubilității în apă.....	14
3.3. Evaluarea stabilității coloristice	15
3.4. Determinarea rezistenței la încovoiere și a modulului de elasticitate	16
3.5. Determinarea cantității de ioni fluorură eliberată	16
3.6. Evaluarea radioopacității	18
Capitol 4. Sisteme adezive utilizate în combinație cu materiale de tip giomer	19
4.1. Prepararea și caracterizarea unor noi sisteme adezive dentare	19
4.2. Evaluarea adeziunii	20
4.2.1. Metoda infiltrației marginale	21
4.2.2. Metoda microscopiei electronice de baleiaj (SEM)	22
4.2.3. Metoda microscopiei de forță atomică (AFM).....	22

4.3. Studiul comparativ al performanței sistemelor adezive.....	25
4.4. Studiu comparativ al performanței giomerilor de sigilare.....	38
Capitol 5. Evaluarea biocompatibilității materialelor	43
5.1. Metode de evaluare a biocompatibilității in vitro	43
5.2 Metodă de evaluare a biocompatibilității.....	43
5.3 Evaluarea citotoxicității și biocompatibilității giomerilor	43
Capitol 6. Concluzii generale.....	51
Capitol 7. Bibliografie.....	55

Capitol 1. Biomateriale avansate cu utilizare în medicină

1.1 Biomateriale de restaurare, regenerare și remineralizare țesuturilor dentare

Studiile de cercetare din domeniul stomatologiei restaurative din ultimele decenii s-au axat pe găsirea unui material ideal de restaurare ca alternativă la amalgamul de argint.

Această nevoie a dus la dezvoltarea unor noi clase de materiale de restaurare dintre care rășinile compozite ocupă primul loc. În perioada 1958-1962, Bowen, prin descoperirea monomerului Bis-GMA, a pus bazele dezvoltării unei noi clase de rășini adezive, cunoscute în prezent sub numele de rășini diacrilice, care pot fi simple (rășini diacrilice neșarjate) sau compozite (rășini șarjate cu umplutură anorganică) [1], [2]. Rășinile diacrilice au astăzi o mare răspândire în toate ramurile stomatologiei adezive (odontologie, parodontologie, ortodonție, protetică, chirurgie), datorită proprietății lor de adeziune prin sistemele adezive atât la țesutul dentar cât și la alte substraturi.

Ca și alternativă la rășinile compozite s-a dezvoltat o nouă clasă de materiale de restaurare dentară: cimenturile ionomere de sticlă (CIS). Acestea au fost introduse pe piață în 1970 de către firmele Dentsply și ESPE în urma cercetărilor realizate de Wilson și Kent. Acestea reprezintă un amestec de sticlă calciu alumino-floro-silicată cu acizi policarboxilici. Avantajele acestei clase de materiale de restaurare sunt o biocompatibilitate crescută față de rășinile compozite, o adeziune chimică la țesuturile dentare fără necesitatea utilizării unui sistem adeziv, lipsa contracției de priză, eliberarea de ioni fluorură cu efect de remineralizare a țesuturilor dentare.

După observarea atentă a acestor două clase de materiale, rășinile diacrilice și cimenturile ionomere de sticlă, s-a încercat obținerea unor materiale hibride care să preia avantajele ambelor clase de materiale și să anihileze sau reducă dezavantajele acestora. Astfel au apărut pe piață cimenturile ionomere de sticlă modificate cu rășini (1991), compomerii (1996) și în ultimul timp giomerii (2000).

1.1.1 Matrici polimerice naturale și sintetice

Polimerii naturali au aplicații în multe ramuri din domeniul stomatologiei: prevenția, odontologia, endodonția, protetica și chirurgia. Pentru matricile polimerice folosite în special în

augmentările osoase caracteristicile principale sunt biocompatibilitatea, imitarea structurii tridimensionale a țesuturilor dure și proprietăți fizice și mecanice cât mai apropiate de cele ale țesuturilor pe care le înlocuiesc. Resorbabilitatea lor nu este deloc de neglijat, ele trebuie să fie tratat înlocuite de țesut nou regenerat.

În acest scop, au fost utilizați o varietate de polimeri naturali, inclusiv proteine ale matricei extracelulare cum ar fi colagenul; polizaharide precum chitosanul, alginatul, amidonul și celuloza; precum și glicozaminoglicani, cum ar fi acidul hialuronic. Unii dintre polimerii naturali pot furniza un model pentru formarea apatitelor biomimetice, lucru foarte dorit pentru inducerea colonizării rapide a osului. Studii recente efectuate de Hutchens și colab. au evidențiat capacitatea de înlocuire a țesutului osos de către compozite pe baza de celuloză (fig.1.1) și hidroxiapatită [3].

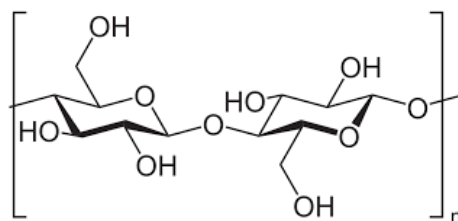


Fig.1.1 Structura celulozei

Matricile polimerice sintetice le regăsim într-o gama variată în rășinile compozite și în materialele hibride dezvoltate mai recent: compomeri, ormoceri și giomeri. Se cunoaște faptul că rășinile compozite utilizate în stomatologie conțin în mod obișnuit o matrice organică bazată pe bisfenol A glicidil metacrilat (Bis-GMA) 2,2-bis[4-(2'-hidroxi-3'-metacrililoiloxi-propoxi)fenil]propan), care se folosește în mod uzual de la sinteza acestuia de către Bowen (1956).[6]

1.1.2. Pulberi anorganice

Rășinile compozite conțin umplutură anorganică înglobată în matricea polimerică. Proporția de umplutură anorganică variază între 70-85% în funcție de producători și de domeniul de aplicabilitate, la fel și compoziția umpluturii: sticle, silicați, hidroxiapatite, cuarț, etc. Tipul de particule variază de asemenea atât în formă : rotunde, bastonașe, perle, fibre, aciforme cât și în dimensiuni. Prin adăugarea de umpluturi, s-a căutat să se îmbunătățească rezistența mecanică a rășinilor, estetica și să se scadă contracția de polimerizare și coeficientul de dilatare termică.

De asemenea șarjarea rășinilor cu umplutură anorganică îmbunătățește proprietățile fizico-chimice, optice, mecanice, cum ar fi : rezistența la tracțiune, compresie, modulul de elasticitate, duritatea și rezistența la abraziune.

1.2. Sisteme adezive cu aplicații în stomatologie

1.2.1. Compoziția sistemelor adezive

La fel ca și rășinile compozite, sistemele adezive conțin ca și componentă de bază monomeri acrilici. Ei alcătuiesc matricea care înglobează celelalte componente: solvenți organici, sistemul de activare a polimerizării, inhibitorii și câteodată și umplutura anorganică.

Matricea de monomeri este cea care oferă adezivului proprietățile fizico-mecanice după realizarea polimerizării. Se descriu două tipuri de monomeri ce intră în componența sistemelor adezive : monomeri cu potențial de reticulare (reticulanți) și monomeri funcționali. Monomerii funcționali conțin o singură grupare polimerizabilă și o grupare funcțională care le dă caracteristicile de monomeri funcționali spre deosebire de monomerii reticulanti care conțin două sau mai multe grupări polimerizabile. Prin polimerizare, monomerii funcționali formează o rețea lineară iar monomerii reticulanți duc la formarea unei rețele reticulate tridimensionale care oferă o rezistență și proprietăți mecanice superioare adezivului. Acesta este motivul pentru care este importantă reticularea monomerilor în vederea creșterii rezistenței adezivului.

1.2.2. Clasificarea sistemelor adezive

1.2.2.1 Clasificare după numărul timpilor de aplicare

În cazul în care sistemul adeziv conține 3 componente: agentul de gravare (acid ortofosforic), primerul (monomeri funcționali) și adezivul propriu-zis (monomeri reticulanți), acesta se aplică în trei timpi .

Atunci când monomerii reticulanți și cu cei funcționali se condiționează în același flacon (sistem adeziv cu gravare/spălare) și atunci când agentul de gravare e condiționat împreună cu primerul în același flacon și adezivul propriu-zis este condiționat separat (sistem adeziv autogravant), sistemul adeziv se aplică în doi timpi.

În sistemul adeziv autogravant în care agentul de gravare, primerul și adezivul propriu-zis sunt condiționați în același flacon adezivul se aplică într-un singur pas (timp).

1.2.2.2 Clasificare după mecanismul de adeziune

Mecanismul de adeziune la smalț și dentină este de fapt un proces de înlocuire a mineralelor îndepărtate din țesutul dur dentar cu monomeri de rășină adezivă care prin polimerizare rămân blocați în porozitățile create ceea ce asigură o legătură micromecanică importantă. Acest fenomen a fost numit hibridizare și are ca și rezultat formarea stratului hibrid. Clasificarea sistemelor adezive contemporane se face în funcție de mecanismul de adeziune. Luând în considerare aceasta abordare, în prezent sunt utilizate trei mecanisme de adeziune în sistemele de adezivi moderne, și anume: adezivi cu gravare și spălare, adezivi autogranvanți și adezivi pe bază de cimenturi ionomere de sticlă [5], [6]

1.3. Giomeri.

1.3.1. Istoric

În ultimele decenii, a fost introdusă pe piața internațională (2000) o nouă clasă de materiale hibride, numite giomeri, de către firma Shofu (Tokio, Japonia). Giomerii reprezintă un nou concept de biomaterial stomatologic adeziv bazat pe tehnologia sticlei pre-reactionate (Pre-Reacted Glass, PRG).

1.3.2. Compoziție, proprietăți și aplicații

Giomerii reprezintă un material compozit cu structură specială fiind compus din matricea organică și o umplutură hibridă în care una din componente este sticla pre-reacționată. În giomeri, particulele de sticle fluoroaluminosilicatică reacționează cu acidul poliacrilic, formând glass-ionomeri pre-reacționați, care apoi sunt introduși în rășina organică. Deoarece reacția acid-bază se desfășoară înainte de amestecarea cu rășina, se formează un strat extins de hidrogel care înconjoară particulele de sticlă, conducând la formarea unei matrici bine definite, în care eliberarea și reîncărcarea cu ioni fluorură pot fi controlate.

Ca și material de restaurare a țesutului dentar giomerii sunt capabili să îmbine avantajele a două clase mari de material dentare de restaurare : rășini compozite și CIS, prezentând proprietăți optice , mecanice , radioopacitate crescută , stabilitate clinică, proprietăți de manipulare asemănătoare cu ale rășinilor compozite, în același timp preluând biocompatibilitatea și proprietățile de eliberare și reîncărcare cu ioni fluorură ale CIS. Datorită

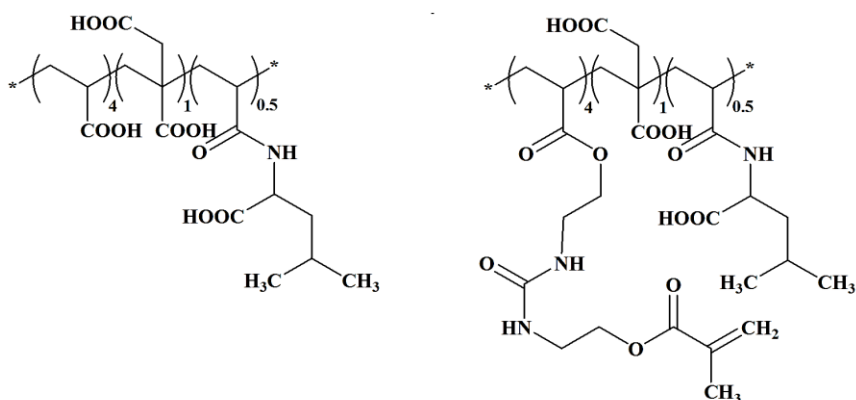
acestor avantaje indicațiile lor de utilizare sunt cele mai diverse și complexe în practica stomatologică de astăzi [7], [8], [9], [10]

Capitol 2. Biomateriale inteligente de tip giomer

Obiectivul cercetării a fost prepararea și caracterizarea unei serii de noi biomateriale din clasa giomerilor. Giomerii noi, experimentali, au fost obținuți sub forma unor paste, prin dispersia unor umpluturi hibride cu compoziție nouă în matrici de rășină fotopolimerizabile originale. Noutatea în compoziția giomerilor experimentali constă în folosirea unor acizi polialchenoici bazați pe acid acrilic, acid itaconic și N-acriloil leucină grefați P(AA-co-IA-co-LeuM) sau nu P(AA-co-IA-co-Leu) cu grupări metacrilice fotopolimerizabile, ca și componentă principală de plecare în sinteza sticlelor pre-reacționate în locul acidului poliacrilic folosit de firma Shofu. În plus, un alt element de noutate îl constituie folosirea unui monomer uretan-tetrametacrilic analog de Bis-GMA în matricea de rășină în locul monomerului dimetacrilic Bis-GMA comercial din giomerii comerciali. Ipoteza de la care se pleacă este aceea ca asemenea structuri introduse în matricea organică vor conduce la giomer cu contracție la polimerizare scăzută și grade ridicate de polimerizare a grupărilor vinilice.

2.1. Modele experimentale pentru umpluturile hibride utilizate în giomeri

Au fost obținute două sticle pre-reacționate (PRG1 și PRG2) experimentale prin metoda convențională utilizată la prepararea cimenturilor ionomere de sticlă. PRG1 a fost preparată prin amestecarea soluției apoase 50% de acid polialchenoic P(AA-co-IA-co-Leu) cu o pulbere de sticlă superficial activă având compoziția oxidică SiO₂ (49%), Al₂O₃ (22%), CaF₂ (29%), într-un raport de greutate de 1/2,4.



P(AA-co-IA-co-Leu)

P(AA-co-IA-co-LeuM)

Fig. 2.1. Structura acizilor polialchenoici utilizați în PRG experimentale

După 7 zile, sticla pre-reacționată PRG1 a fost uscată în etuvă la 95°C timp de 24 h. În final, PRG1 a fost marunțită într-o moară cu bile și cernută pentru a obține o pulbere fină. PRG2 a fost obținută într-o manieră asemănătoare; cu singura diferență că în loc de acidul polialchenoic P(AA-co-IA-co-Leu) a fost utilizat copolimerul P(AA-co-IA-co-LeuM). Structura acizilor polialchenoici utilizați în giomerii experimentali este arată în figura 2.1.

Pe baza umpluturii pre-reacționate PRG2, a sticlei radioopace și respectiv a fluorhidroxiapatitei (FHAp) au fost preparate 3 umpluturi hibride, cu scopul de a le utiliza în prepararea giomerilor experimentali.

Compozițiile umpluturilor hibride experimentale sunt arătate în tabelul 2.1:

Tabelul 2.1. Compozițiile umpluturilor hibride experimentale

Nr. Crt.	Umplutura hibridă			
	PRG2	FHAp	Sticlă radioopacă	Al ₂ O ₃
U1	50%		50%	
U2	35%	15%	50%	
U3	30%	10%	50%	10%

2.2. Modele experimentale pentru matricea organică utilizată în giomeri

În vederea obținerii unor giomeri cu proprietăți îmbunătățite, în componența rășinilor, pe lângă monomerul Bis-GMA comercial (Bis-GMAcom) a fost folosit un analog experimental uretan-tetrametacrilat al Bis-GMA (Bis-GMAexp).

Analogul experimental al Bis-GMA (Bis-GMAexp) a fost obținut prin adăugarea de metacrililoxiethyl-2-bromoetiluretan la grupările hidroxil ale Bis-GMA comercial. Ca monomer de diluție s-a utilizat dimetacrilatul de trietilenglicol (TEGDMA). Componentele sistemului de inițiere fotochimică, fotosensibilizatorul CQ (0,5% în greutate), acceleratorul DMAEM (0,65% în greutate) și inhibitorul BHT (800 ppm) au fost dizolvate în TEGDMA înainte de amestecarea cu monomerul de tip Bis-GMA (Bis-GMAcom sau Bis-GMAexp).

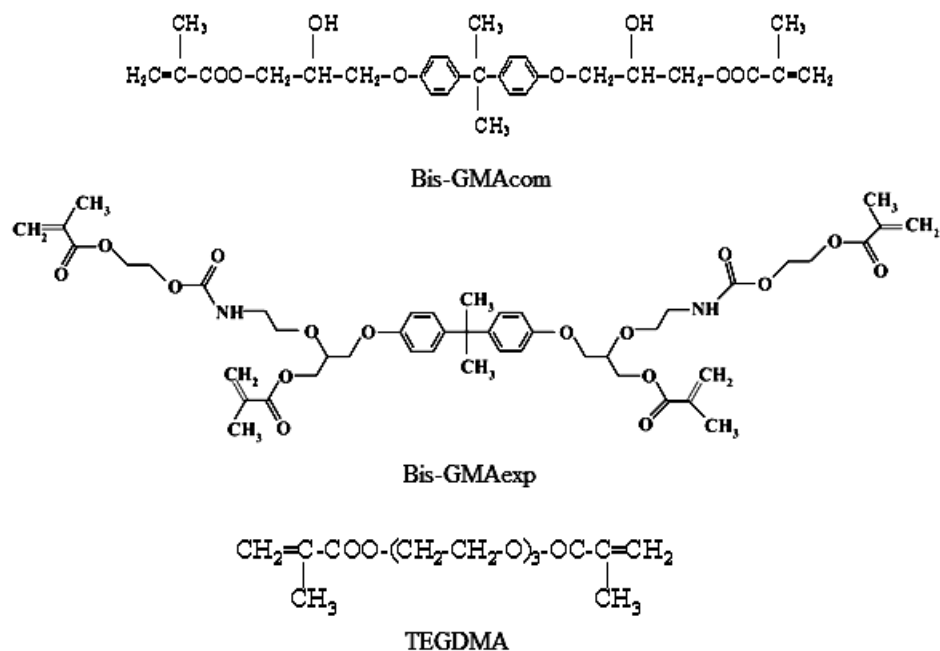


Fig. 2.2 Structura monomerilor utilizați în matricea organică a giomerilor experimentali

2.3. Prepararea și caracterizarea structurală a giomerilor de restaurare și a giomerilor de sigilare

Diferența între giomerii de restaurare și cei de sigilare constă în vâscozitatea lor și deci în procentul de umplutură adăugat în matricea organică: raportul pulbere/lichid este de 45/55 în giomerii de sigilare și 80/20 în giomerii de restaurare. Consistența giomerilor de restaurare este chitoasă și se folosesc la refacerea dintelui în urma pierderii țesutului dentar. Consistența giomerilor de sigilare e fluidă pentru a fi capabili să se adapteze perfect la relieful dentar. Ei se aplică pe dintele sănătos pentru a preveni apariția cariilor.

Giomerii de restaurare experimentali au fost preparați sub formă de monopaste fotopolimerizabile prin amestecarea unei matrici organice de rășină cu umpluturile hibride U1, U2 și respectiv U3 prezentate în paragraful anterior. Matricea de rășină a fost constituită din Bis-GMA comercial sau Bis-GMAexp modificat și respectiv trietilenglicol dimetacrilat (TEGDMA). În matricea de rășină a fost dizolvat sistemul de inițiere fotochimic (camforchinonă 0,5% și dimetilaminoetilmetacrilat 1% față de amestecul de monomeri).

Compoziția pastelor de giomeri de restaurare experimentali este prezentată în tabelul 2.2

Tabelul 2.2. Compoziția pastelor de giomeri de restaurare experimentali

Nr. Crt.	Matrice organică			Umplutura hibridă
	Bis-GMAcom	Bis-GMAexp	TEGDMA	Cod
G1	70%		30%	U1
G2	70%		30%	U2
G3	70%		30%	U3
G4		70%	30%	U1
G5		70%	30%	U2

Pe baza celor două componente, matricea organică și umplutura hibridă, s-au realizat 4 compoziții de material giomer de uz stomatologic de sigilare, sub formă de paste fotopolimerizabile. Amestecurile de monomeri s-au preparat din monomerul de bază Bis-GMA comercial sau monomerul uretan-dimetacrilic original Bis-GMAexp și respectiv monomerul de diluție dimetacrilat de trietilen glicol (TEGDMA). Umpluturile folosite au avut în componență fluorhidroxiapatită, sticlă radioopacă și sticlele pre-reacționate originale PRG1 și PRG2.

Tabelul 2.3. prezintă compozițiile materialelor giomere de sigilare experimentale

Tabelul 2.3. Compozițiile materialelor giomere de sigilare experimentale

Cod giomer	Matricea organică (L)		Umplutura hibridă (P)		Raport șarjare (P/L)
	Component	%	component	%	
S11.	Bis-GMA _{com}	60	PRG1	20	1/1
	TEGDMA	40	Fluorhidroxiapatită	20	

			Sticlă radioopacă	60	
S12.	Bis-GMA _{com} TEGDMA	60 40	PRG2 Fluorhidroxiapatită Sticlă radioopacă	20 20 60	1/1
S21.	Bis-GMA _{exp} TEGDMA	60 40	PRG1 Fluorhidroxiapatită Sticlă radioopacă	20 20 60	1/1
S22.	Bis-GMA _{exp} TEGDMA	60 40	PRG2 Fluorhidroxiapatită Sticlă radioopacă	20 20 60	1/1

Capitol 3. Testarea noilor biomaterialelor avansate de tip giomer

Odată cu prepararea giomerilor experimentali aceștia au fost testați pentru a obține formulările cele mai avantajoase pe care să le supunem mai departe unui studiu clinic.

3.1. Determinarea gradului de conversie

În urma evaluării dublelor legături reziduale și deci a gradului de conversie a monomerilor concluzia a fost că există o diferență semnificativă între conversia (100%-DLR%) obținută pentru giomerii experimentali pe bază de Bis-GMA comercial și giomerii originali pe bază de derivat uretanic de Bis-GMA_{exp}. Astfel, în cazul G4 și G5 conversia este 78,9% și respectiv 72,12%, față de 45,27%, 54,26% și 49% înregistrată pentru G1, G2 și respectiv G3. În concluzie, giomerii derivând de la derivatul de Bis-GMA original prezintă conversii mult îmbunătățite față de giomerii pe bază de Bis-GMA comercial.

Tabel 3.1. Dublele legături reziduale și gradul de conversie înregistrate pentru giomerii experimentali

Cod probă	Abs _I 1637,27 cm ⁻¹	Abs _I 1608,34 cm ⁻¹	Abs _F 1637,27 cm ⁻¹	Abs _F 1608,34 cm ⁻¹	DLR %	GC %
G1	0,0552337	0,0436631	0,0523952	0,0756773	54,73	45,27
G2	0,065678	0,0446629	0,0334386	0,0497155	45,74	54,26

G3	0,0700374	0,0504211	0,0460098	0,0649384	51,00	49%
G4	0,0517486	0,0166301	0,0062120 1	0,0094618 4	21,10	78,9
G5	0,0561891	0,0181846	0,0239651	0,0278212	27,88	72,12

3.2. Determinarea absorbției și solubilității în apă

Determinarea absorbției de apă a fost realizată în conformitate cu standardul internațional ISO 4049/2000. În figura 3.1. este prezentată absorbția apei după 1, 2 3, 6 și 7 zile pentru cei 5 giomeri experimentali.

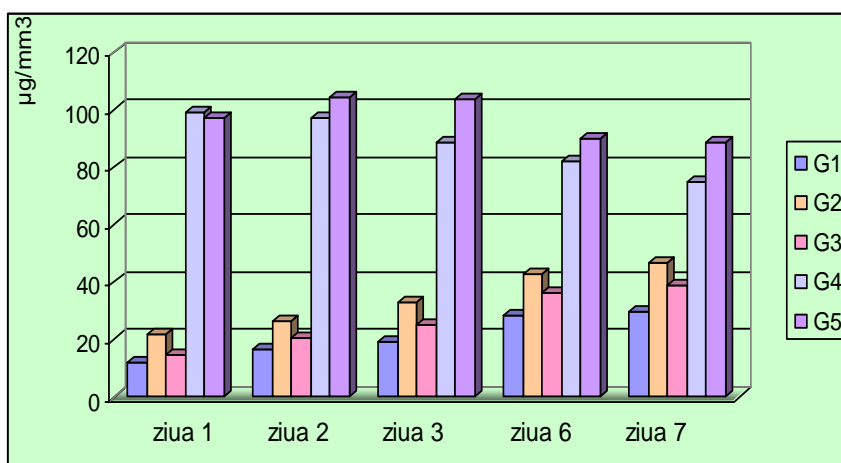


Fig. 3.1. Absorbția apei pentru giomerii experimentali G1-G5

Din fig. 3.1 se poate observa că valorile absorbției de apă pentru giomerii G1, G2, G3 sunt mult mai mici decât valorile pentru giomerii G4 și G5. În acest caz, absorbția apei este influențată în primul rând de natura matricei polimerice din giomeri și mult mai puțin de natura umpluturii hibride; valorile mari înregistrate în cazul giomerilor G4 și G5 se datorează matricii polimerice uretanice hidrofile din componența lor.

Solubilitatea în apă pentru giomerii derivând de la Bis-GMA comercial a înregistrat valori negative: $-5,09 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ în cazul G1, $-2,83 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ în cazul G2, și respectiv $-2,26 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ în cazul G3. În cazul giomerilor G4 și G5 solubilitatea a înregistrat valori pozitive, ajungând la $10, 12 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ în cazul G5.

3.3. Evaluarea stabilității coloristice

Pentru determinarea diferențelor de culoare a giomerilor la imersarea acestora în coloranți alimentari, s-au confecționat epruvete sub formă de disc (30 mm diametru x 2 mm grosime) care s-au întărit în același mod în 17 puncte de pe suprafața epruvetei. Epruvetele de giomeri confecționate au fost menținute 72 ore în vin roșu (pH=2,5), cafea neagră concentrată (pH=4,6) și respectiv suc de portocale (pH= 3,8) , conform normei ADA Specification nr.12 și Lee Pharmaceuticals. După stocare, epruvetele de giomeri s-au plasat într-un spectrometru marca Unicam 4 UV-VIS. Au fost înregistrate coordonatele (a*, b*, L*) din spectrul de reflexie, iar diferențele de culoare ΔE^* în sistemul CIELAB au fost calculate cu ajutorul formulei de mai jos:

$$\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$$

unde ΔL^* reprezintă diferența de luminozitate între cele două probe

Δa^* reprezintă diferența între coordonatele “roșu-verde” corespunzătoare celor două probe

Δb^* reprezintă diferența între coordonatele “galben-albastru” corespunzătoare celor două probe

Diferențele (Δa^* , Δb^* , ΔL^*) au fost determinate de asemenea prin analiza imaginilor digitale a stării finale și inițiale ale epruvetelor de giomeri utilizând o aplicație software proprie (“Discolor”).

În tabelul 3.2. sunt prezentate valorile L*, a*, b* și ΔE^* pentru cei 5 giomeri experimentali în starea inițială (Referința- R) și finală după menținerea în vin roșu (W), cafea (C) și respectiv suc de portocală (J).

Tabelul 3.2. Diferențele de culoare ale giomerilor experimentali după menținerea în vin roșu, cafea și suc de portocală

	G1				G2				G3				G4				G5							
	L	a	b	ΔE	L	a	b	ΔE	L	a	b	ΔE	L	a	b	ΔE	L	a	b	ΔE				

R*	79,4	1,1	7,9	-	76,5	1,4	8,6	-	89,5	0,1	5,1	-	81,8	1,24	9,38	-	85,34	1,24	9,6	-
W*	74,5	-0,2	19,2	12,4	76,9	-0,7	17,8	9,4	85,1	-2,3	24,5	20,03	77,4	-0,5	14,74	7,18	80,14	-1,1	16,0	8,6
C*	74,7	1,7	12,6	6,6	77,6	1,06	12,5	4,0	86,2	0,18	10,9	6,65	79,2	0,03	1,11	4,7	81,52	-0,4	14,8	6,6
J*	76,9	1,2	9,52	2,9	76,5	0,08	10,9	2,6	89,1	0,03	6,05	1,05	79,7	0,44	10,68	2,58	82,71	-0,2	9,6	2,15

R* - Referința, W*- vin roșu, C*-cafea, J*-suc de portocală

Stabilitatea coloristică a avut rezultate superioare în cazul giomerii pe bază de matrici polimerice uretanice (G4 și G5) care s-au colorat cel mai puțin. Aceste rezultate au fost obținute prin două metode: utilizând spectrele de reflexie și respectiv prelucrarea imaginilor digitale cu ajutorul unei aplicații software (DISCOLOR).

3.4. Determinarea rezistenței la încovoiere și a modului de elasticitate

Rezistențele la încovoiere ale giomerilor experimentali(atât pe baza de Bis-GMA comercial cât și experimental) sunt apropiate de rezistența materialului comercial Beautifil II (100,5 MPa) fiind cu 10-12 Mpa mai mici, în schimb modulul de elasticitate pentru materialele experimentale depășește valoarea pentru materialul comercial (9,05 GPa). Valorile pentru rezistența la încovoiere se încadrează în limitele ISO 4049/2000, care prevăd pentru un material compozit de restaurare, limita inferioară de 80 Mpa.

3.5. Determinarea cantității de ioni fluorură eliberată

La testarea eliberării de ioni fluorură rezultatele au arătat după prima zi de depozitare valori cuprinse între 0,25 și 0,47 ppm pentru giomerii experimentali în comparație cu 0,07 ppm pentru giomerul comercial (Beautifil II) și după șapte zile valori de la 3,52 până la 9,26 ppm pentru noii giomeri comparativ cu 2,56 ppm înregistrată pentru cel comercial. Valorile obținute pentru eliberarea cumulată de ioni fluorură au fost mai mari decât pentru produsul Beautifil II pentru toți giomerii experimentali, fiind de doua ori mai mari față de cele obținute pentru produsul comercial, după 60 de zile de imersare în apă bidistilată

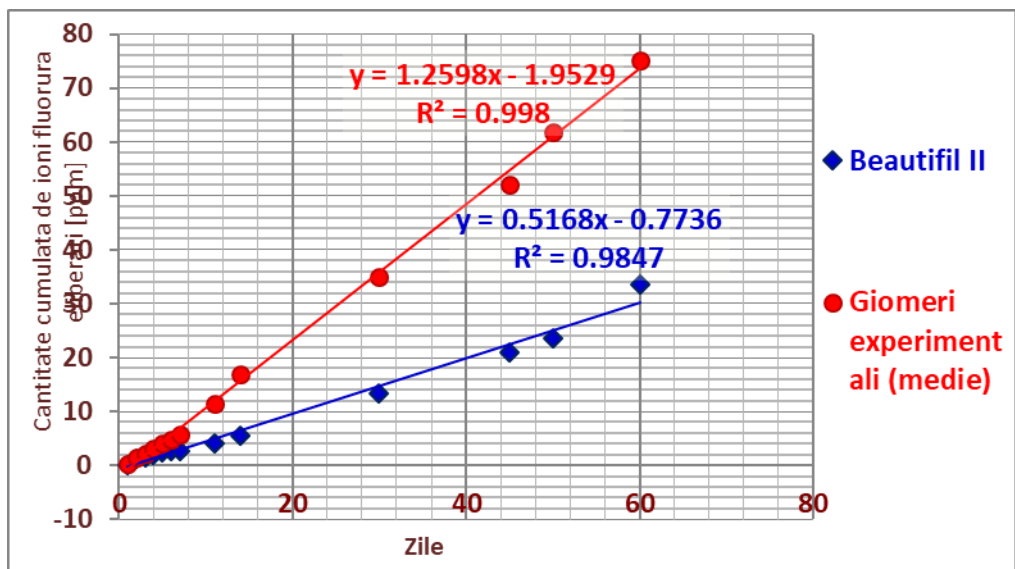


Fig 3.4. Cantitatea cumulată de ioni fluorură eliberată în timp de giomerii experimentali (medie) și giomerul comercial Beautifil II

Cantitatea de ioni fluorură eliberată pentru toți giomerii de sigilare experimentali depășește cantitatea de ioni fluorură eliberată de produsul comercial pentru aceeași perioadă de timp, după 50 zile de stocare în apă distilată, acesta fiind aproximativ de două ori mai mare în cazul giomerilor S11 și S12, și de trei ori mai mare în cazul giomerilor S21 și S22 comparativ cu cea obținută pentru produsul Beautifil II.

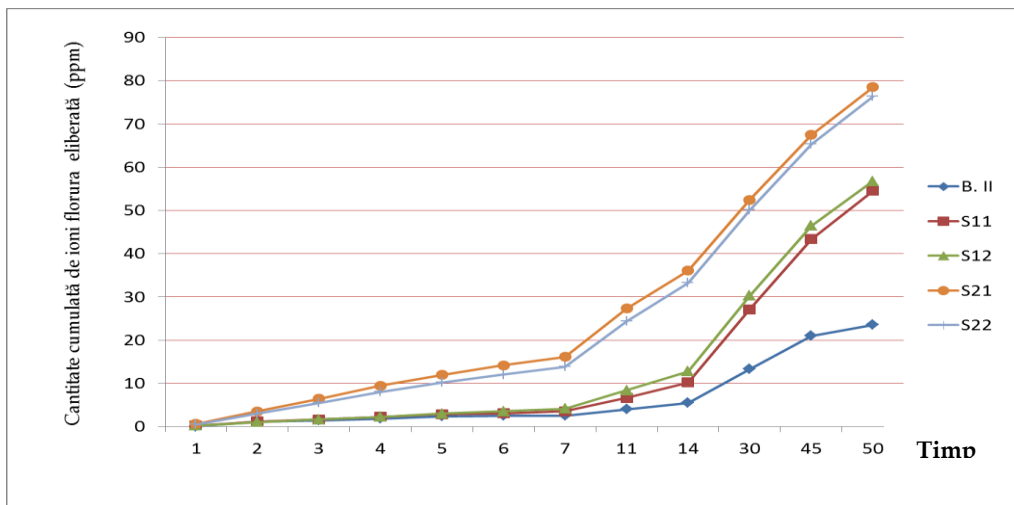


Fig. 3.5. Cantitatea cumulată de ioni fluorură eliberată în timp de giomerii de sigilare experimentali comparativ cu produsul comercial Beautifil II

Diferențele obținute între giomerii de sigilare S11 și S12 pe de o parte și giomerii S21 și S22 pe de altă parte se pot explica luând în considerare natura chimică a monomerului de bază din cele două grupuri de giomeri. Uretan-dimetacrilatul original Bis-GMA1 prezent în compoziția giomerilor S21 și S22, confera matricei polimerice un caracter pronunțat hidrofil și o permeabilitate mai mare pentru eliberarea ionilor fluorură, comparativ cu monomerul Bis-GMA com care are caracter hidrofob și rigiditate ridicată. Dacă se compară între ei giomerii experimentali având aceeași matrice organică, dar sticle pre-reacționate diferite, se poate observa că materialele având în compoziție PRG1, eliberează constant o cantitate cu puțin mai mare de ioni fluorură.

3.6. Evaluarea radioopacității

Valorile de radioopacitate a probelor de giomeri au fost exprimate în grosimi echivalente de aluminiu (mmAl).

Giomer	Beautiful II	G11	G22
Radiopacitate [mm Al]	2.99	2.15	2.21

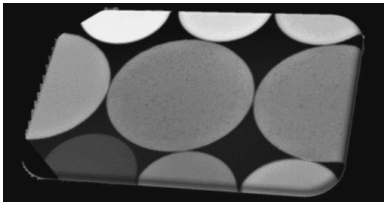


Fig. 3.6. Radioopacitatea giomerilor G11 și G22

După cum se observă din imaginea radiografică alăturată (Fig.3.6), toți giomerii prezintă radioopacitate mai mare decât 2mm Al, fiind peste limita impusă de standardul internațional ISO 4049/2000 (1mm Al). Smălțul dentar are o radioopacitate de 2 mm Al, iar dentina, o radioopacitate de 1 mm Al. O radioopacitate mai mare de 2mm Al a unui material se consideră a fi foarte bună întrucât dă posibilitatea medicului stomatolog de a

distinge clar pe imaginea radiografică interfața dintre material și țesuturile dentare, astfel evitându-se posibilele confuzii de diagnostic, și în consecință un tratament neadecvat.

Capitol 4. Sisteme adezive utilizate în combinație cu materiale de tip giomer

4.1. Prepararea și caracterizarea unor noi sisteme adezive dentare

În acest studiu au fost preparate și investigate două sisteme adezive inovative în doi timpi (A1 și A2) conținând un primer și o rășină adezivă. Cele două sisteme adezive sunt diferite prin primerii diferiți, rășina adezivă fiind aceeași în ambele sisteme. Primerii 1 și 2 (din A1 și respectiv A2) s-au preparat plecând de la acizi polialchenoici modificați cu grupări polimerizabile (PAlk-1MA și respectiv PAlk-2-MA). Palk-1MA reprezintă copolimerul acid acrilic / acid itaconic modificat cu grupări metacrilice. Palk-2-MA reprezintă copolimerul acid acrilic / acid itaconic / N-acriolil leucină modificat cu grupari fotopolimerizabile. Formulele acizilor polialchenoici folosiți în primerul 1 și 2 sunt prezentate în figura 4.1

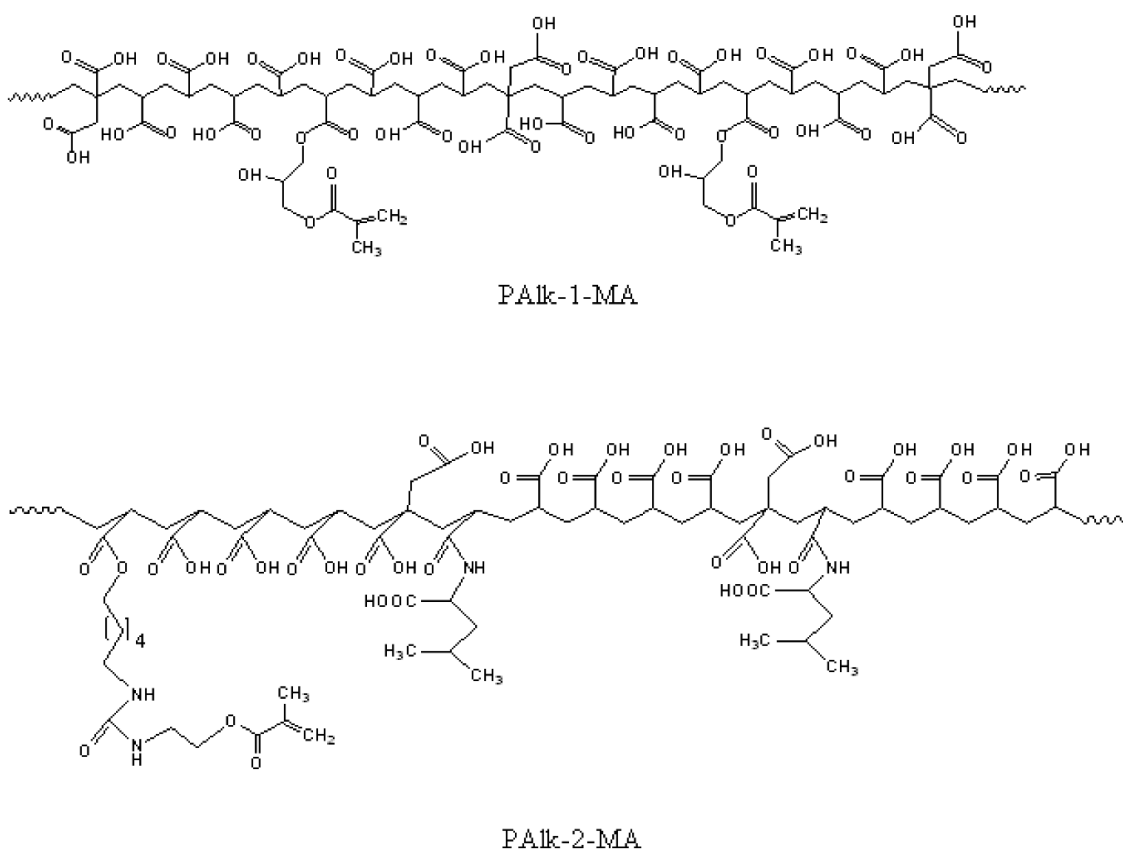


Fig.4.1 Formulele acizilor polialchenoici: Palk-1-MA și Palk-2-MA

Giomerul de restaurare pe bază de Bis-GMA comercial și PRG2 a fost selectat după evaluarea proprietăților fizico-chimice ale giomerilor experimentali și s-a testat mai departe din punct de vedere al adeziunii și adaptării la pereții cavitațiilor cu cele două sisteme adezive experimentale.

4.2. Evaluarea adeziunii

Evaluarea microinfiltrării la interfața dinte / restaurare a fost evaluată prin metoda penetrării lichidelor colorate și de asemenea prin termografia de detecție sincronă, o nouă metodă de investigare nedistructivă. Morfologia interfeței a fost examinată prin tehnici de scanare prin microscopie electronică (SEM) și prin tehnici de microscopie de forță atomică (AFM). Giomerul comercial Beautifil II și adezivul său FL-Bond II au fost utilizați pentru comparație. Sistemul adeziv comercial utilizat ca referință a fost FL-Bond II, sistem în doi timpi compus dintr-un primer și un adeziv propriu-zis (bonding). Primerul FL-Bond II conține un monomer promotor al adeziunii fără conținut de acetonă sau HEMA

Compoziția sistemelor adezive investigate este prezentată în Tabelul 4.1.

Tabelul 4.1

Compoziția sistemelor adezive investigate în acest studiu

Cod	Compoziția sistemelor adezive				
	Monomeri/poli meri de baza	Monomeri de diluție	Sistem de inițiere fotochimic	Solvenți	Umplu tură
Primer 1	PAIk-1-MA (30%)	HEMA (32%)	CQ (0,18%) CDFI (1,12%)	H ₂ O (20%) Acetonă (6%)	-
Primer 2	PAIk-2-MA (30%)	TEGDMA (10.7%)			
Primer FL-Bond II Shofu, Tokio, Japonia	4-AET 6-MHPA	-	Initiator fotochimic	H ₂ O Etanol	-

Bonding	Bis-GMA (60%)	HEMA (20%) TEGDMA (18.53%)	CQ (0,49%) DMAEMA (0,98%)	-	-
Bonding FL-Bond II Shofu, Tokio, Japonia	UDMA	HEMA TEGDMA	Initiator fotochimic	-	S-PRG

PAlk-1-MA, copolimer binary al acidului acrilic cu acidul itaconic modificat cu grupări metacrilice; PAlk-2-MA, copolimer ternar al acidului acrilic cu acid itaconic și cu N-acrilolil-L-leucină modificat cu grupari metacrilice; 4-AET, 4- acid acriloxi etil trimelitic; 6-MHPA, 6-metacriloxi-hexil fosfonoacetat; Bis-GMA, 2,2-bis[4-(2-hidroxi-3-metacriloxi-propoxi)fenil]propan; UDMA, 1,6-bis(metacriloxi-2-etoxi-carbonilamino)-2,4,4-trimetilhexan; HEMA, 2-hidroxietil-metacrilat; TEGDMA, trietilenglicol dimetacrilat; CQ, camforchinona; CDFI, clorura de difeniliodoniu; DMAEMA, N,N-dimetilaminoetil metacrilat; S-PRG, sticla pre-reactionata

Abrevieri: %: procent de greutate

4.2.1. Metoda infiltrației marginale

Cea mai utilizată metodă de testare a microinfiltrării descrisă în literatură este infiltrarea lichidelor colorante după o termociclare prealabilă a probelor care simulează îmbătrânirea restaurărilor dentare prin stres termic asemănător cu cel produs în cavitatea orală. Această metodă este o metodă nondistructivă care se bazează pe tehnica penetrării lichidelor în fisuri și defecte de suprafață și presupune prepararea de cavități la nivelul dinților, restaurarea cavităților cu materiale de obturat, izolarea dinților pe suprafața externă exceptând 1 mm în jurul restaurării și apoi introducerea în colorant pentru un anumit interval de timp, 24 de ore. [11] Evaluarea acestei infiltrații se realizează pe secțiuni de dinte care traversează restaurarea, prin acordarea de scoruri în funcție de profunzimea infiltrării conform unui protocol standardizat ISO [12]

O imagine schematică a sistemului de notare ISO a microinfiltrării este prezentat în Fig. 4.2.

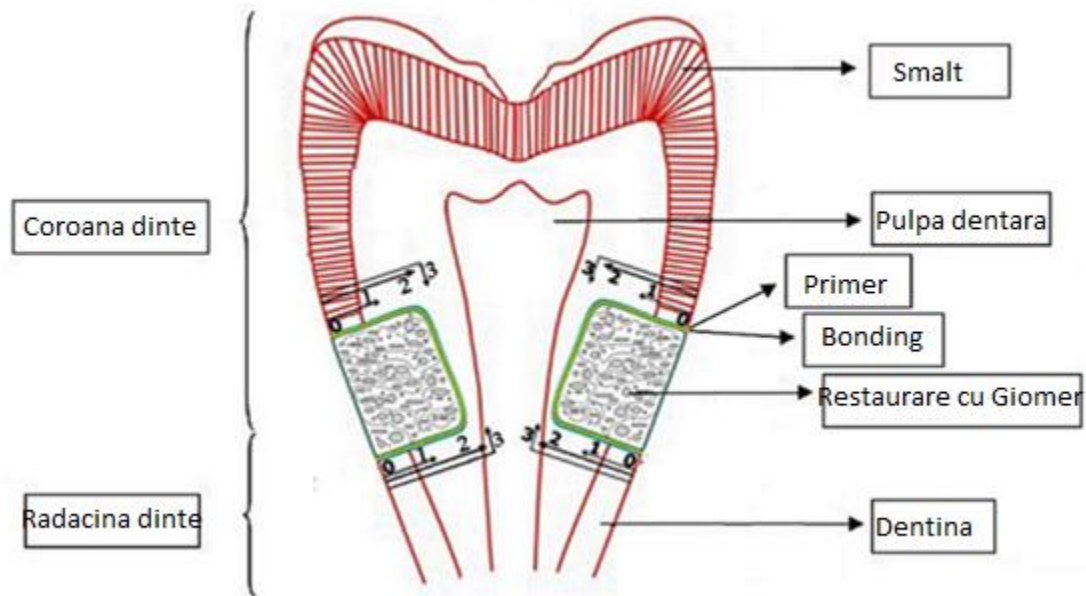


Fig.4.2. Dinte sectionat longitudinal prin restaurările de giomer cu reprezentarea scorurilor de microinfiltrare

0 – lipsa penetrării colorantului ; 1 – colorantul a pătruns până la $\frac{1}{2}$ din peretele cavitații;

2 – colorantul a pătruns pe toată lungimea peretelui cavitații fără a ajunge pe peretele axial; 3 – colorantul ajunge pe peretele axial

4.2.2. Metoda microscopiei electronice de baleiaj (SEM)

Metoda microscopiei electronice de baleiaj (SEM) poate fi utilizată cu succes în investigarea morfologică a texturilor, a conturului și formelor geometrice ale microparticulelor din domenii variate.

Prin analiza SEM se pot vizualiza imagini la mărimi mari (50x-10000x și peste). În această tehnică, suprafața eșantionului este scanată de un fascicul de electroni pentru a produce o varietate de semnale ale căror caracteristici depind de mulți factori, inclusiv de energia fasciculului de electroni și de natura eșantionului, răspunsul fiind colectat de un detector, așa cum este descris de Saghiri și colaboratorii [13]. SEM este folosit pentru analizarea sau măsurarea golurilor care se formează între materialul de umplere și peretele dentinar, realizând astfel analiza interfeței de adeziune. [14]

4.2.3. Metoda microscopiei de forță atomică (AFM)

Microscopia de forță atomică (AFM) este o tehnică de analiză a probei în suprafață, nedistructivă și care spre deosebire de celelalte tipuri de microscopii construiește o hartă a

înălțimilor suprafeței examinate. AFM-ul este folosit în principal pentru obținerea topografiei probei. Fără a o deteriora, se poate vizualiza structura tridimensională a suprafeței examinate. Investigarea probei se face cu ajutorul unui ac denumit cantilever și investigarea se poate face în funcție de contactul cantileverului cu proba: în modul contact, în modul noncontact și semicontact sau contact intermitent. Acest mod este ales în funcție de proprietățile și caracteristicile probei. Imaginea AFM generată poate fi privită din orice unghi și pot fi evaluate dimensiunile denivelarilor (lățime, înălțime, adâncime, diametru).

4.2.4 Metoda termocalorimetrică de evaluare a adeziunii (termografia de detecție sincronă)

Inconvenientele tehnicilor actuale au dus la dezvoltarea unei noi metodologii de detecție automată a defectelor localizate la interfața dinte-material de restaurare prin *termografia de detecție sincronă și algoritmi complecsi de prelucrare de imagini*. Această metodă ne oferă avantajul unei evaluări complete a restaurărilor dentare printr-o tehnică neinvazivă, *radiometria în infraroșu* având un excelent potențial de utilizare în diverse ramuri din domeniul medical. În această metodă, o sursă de excitare modulată în intensitate (lumina) este trimisă pe eșantionul de investigat, generând un câmp de temperatură modulată la locul de absorbție. Acest câmp termic modulată, emis de probă, poate fi măsurat cu un detector în infraroșu. Problema majoră întâmpinată este ca dintele are o structură neomogenă fiind alcătuit din patru tipuri de țesut dispuse în straturi: smalț, dentină, cement, pulpă dentară (Figura 4.3), fiecare strat având propriile sale neomogenități și proprietăți termice și optice. [15]

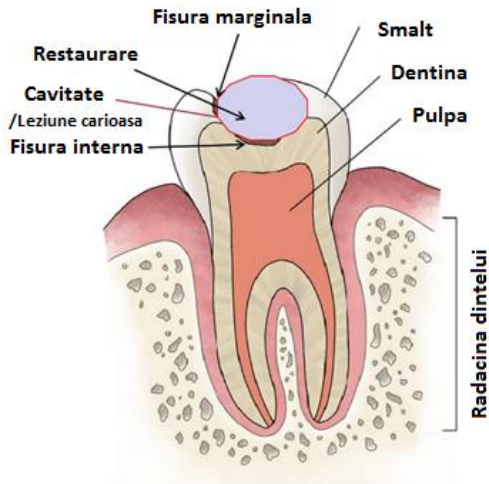


Figura 4.3: Structura unui dinte cu o cavitate restaurată

Totodată cantitatea de lumină împrăștiată este un factor cheie în determinarea adâncimii de pătrundere a luminii în țesut. Un semnal fototermic este generat numai atunci când se eliberează energie termică în urma unui eveniment de absorbție al unui foton în țesutul analizat. Prin urmare, pentru a obține un răspuns fototermic optim (semnal), trebuie aleasă cu grijă lungimea de undă a sursei de excitare, ținând cont atât de coeficienții de împrăștiere, cât și de coeficienții de absorbție ai luminii în smalt și dentină. Din aceste motive, generarea de căldură și transferul termic în medii puternic difuzive cum este dintele este o problemă de fizică complicată în care trebuie să se țină cont în același timp de fenomenele de împrăștiere și absorbție ale fotonilor în fiecare strat al dintelui.

Termografia este o tehnică non-contact în care o camera IR (infraroșu) captează emisiile de radiație infraroșie emise de o suprafață și le afișează într-o hartă de culoare, fiecărei culori corespunzându-i o anumită temperatură. Termografia IR este utilizată fie prin simpla observare a izotermelor pe suprafața de interes (abordare pasivă), fie prin stimularea exterioară a răspunsului termic (abordare activă), în scopul de a obține un bun contrast termic între zona de interes și fundal (background).

În stomatologie termografia IR este folosită îndeosebi pentru monitorizarea temperaturii de polimerizare a compozitelor dentare în timpul procesului de priză. [16], [17]. Există doar două publicații recente (2013) în care s-a evaluat interfața dintre materialul de obturare și dinte prin termografia de detecție sincronă (LIT) [18], [19]

Împrăștierea luminii în dinte este mare, acesta fiind un mediu foarte neomogen din punct de vedere optic. De pildă, datorită prezenței canaliculilor dentinari și a componentelor organice, difuzia luminii este mai mare în dentină față de smalt, care este relativ translucid.

4.3. Studiul comparativ al performanței sistemelor adezive

Evaluarea microinfiltrării

Scorul de infiltrare a colorantului și procentul de infiltrare calculat raportat la lungimea interfeței dinte-restaurare au fost determinate pe 42 de felii de dinți, cu o singură felie selectată din fiecare dinte. Felia cu cea mai mare infiltrare a colorantului a fost aleasă ca reprezentativă pentru dintele respectiv.

Cele două restaurări de pe fiecare dintre feliile selectate au fost investigate utilizând un microscop inversat Olympus KC301 (Olympus America, Center Valley, PA, SUA) la o mărire de 40x. Lungimea de infiltrare a colorantului de-a lungul interfeței de restaurare a dinților a fost înregistrată în μm folosind software-ul QuickPhoto Micro 2.2 (Olympus). Infiltrarea colorantului la marginea în smalț și la marginea în dentină a restaurării, a fost deasemenea evaluată folosind sistemul de scoruri ISO pentru evaluarea microinfiltrării. [12]

Procentele de infiltrare a colorantului au fost calculate folosind formula de mai jos:

$$\text{Procent de infiltrare a colorantului} = \frac{\text{lungimea interfeței infiltrată cu colorant}}{\text{lungimea totală a interfeței}} \times 100$$

Morfologia interfeței:

Secțiuni reprezentative pentru diferite scoruri de microinfiltrare au fost selectate din fiecare grup pentru a evalua morfologia interfeței.

Analizele SEM au fost efectuate utilizând un microscop electronic cu scanare Quanta 3D FEG D9399 (FEI, Hillsboro, OR, SUA). Probele au fost preparate înainte de analiză prin plasarea feliilor de dinte pe banda de carbon și acoperirea cu aur de 10 nm evaporat într-o atmosferă de argon (Sputter Coater Agar). Învelișul subțire de aur a fost aplicat prin 3 pulverizări succesive de 10 secunde fiecare .

Investigarea AFM a suprafețelor de dinți selectate a fost efectuată utilizând un microscop cu sonde de scanare (JEOL, JSPM 4210, Tokyo, Japonia). Microscopul a fost operat în contact intermitent, cunoscut și ca «tapping» mod. Cantilever-ul folosit a avut o formă triunghiulară și un vârf de nitrură de siliciu (NSC11, MicroMasch, Sofia, Bulgaria). Frecvența rezonantă în cantilever a fost cuprinsă între 260 și 330 kHz, iar constanta arcului a fost de aproximativ 48 N /

m. Atât o rată scăzută de scanare de 1 Hz, cât și o rată mai mare în intervalul 2-6 Hz au fost utilizate pentru o imagistică optimă. Toate experimentele AFM au fost efectuate în condiții de temperatură ambiantă de laborator (aproximativ 20 ° C). Au fost repetate observațiile AFM pe următoarele zone diferite de scanare de pe suprafața probei (adică pentru diferite mărimi): 20 x 20 μm^2 până la 10 x 10 μm^2 . Imaginile AFM au fost obținute din cel puțin cinci zone macroscopice identificate separat pe fiecare probă. Toate imaginile au fost procesate conform procedurii standard AFM. Topografia de suprafață, faza și amplitudinea au fost înregistrate simultan.

Pentru analiza cu ajutorul termografiei de detecție sincronă setarea experimentală IR a fost făcută după cum e descrisă în literatură [20]. Aceasta include o sursă de căldură, un generator de undă, o cameră IR și un computer pentru achiziția de date (figura 4.4).

Stimularea optică modulată de intensitate ($f_0 = 0,2$ Hz) a fost furnizată de un laser Nd: YAG dublat în frecvență (Laser Quantum OPUS cu $\lambda = 532$ nm și putere reglabilă, cu putere maximă de 0,5 W). Având în vedere difuzia termică, $\alpha_{\text{dentină}} = 26 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ și $\alpha_{\text{smalț}} = 42 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [21] [22] lungimile de difuzie termică la această frecvență sunt de aproximativ 600 μm în dentină și 800 μm în smalț. Punctul laser a fost focalizat pe interfețele restaurare- smalț sau restaurare-dentină, la o distanță corespunzătoare de margina probei. Camera IR (seria FLIR 7200, cu o serie de detectori InSb sensibili în domeniul de lungimi de undă de 1,5-5,1 μm) a înregistrat modificările temperaturii suprafeței probelor la o rată a cadrelor de 100 imagini/ s-1. Semnalele furnizate de camera IR și semnalul de referință au fost trimise la modulul de detectare sincronă, care înregistrează pixel cu pixel semnalul IR și calculează amplitudinea și faza componentei sale modulate la frecvența f_0 , precum și imaginea continuă. Axa optică a camerei a fost perpendiculară pe suprafața investigată. Prin utilizarea unui obiectiv macro (tip G1) cu o distanță de lucru de 300 mm, se obține o rezoluție spațială de 30 μm . Puterea medie a laserului (setată la 50 mW) a fost măsurată cu ajutorul unui măsurător de laser cu lungimi de undă reglabile între 400-1100 nm. Pentru a crește raportul semnal-zgomot, semnalul IR a fost setat la o medie de peste 50 de perioade de excitație.

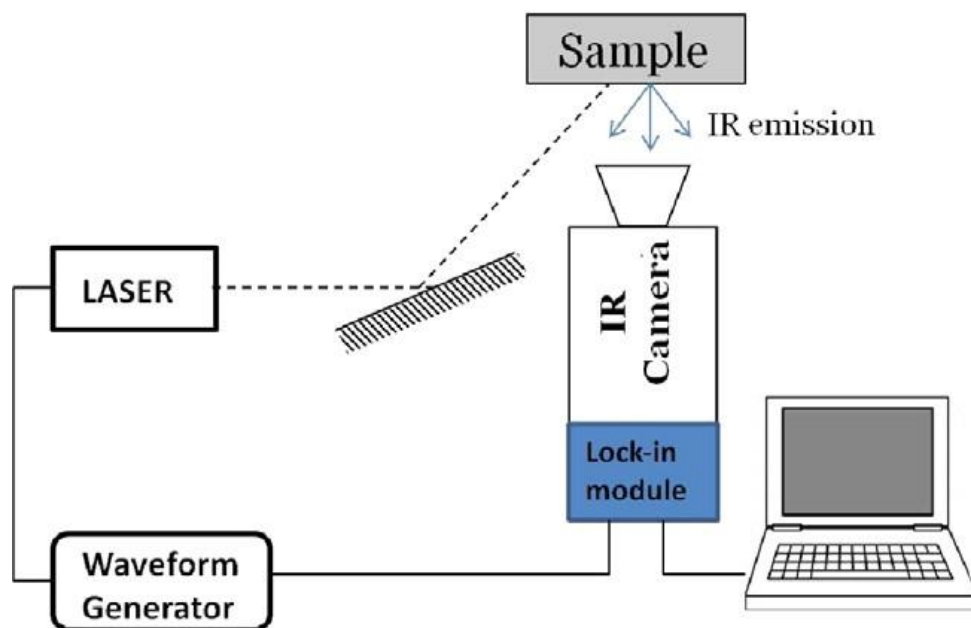


Fig. 4.4. *Setarea experimentală pentru termografia de detecție sincronă*

Analiza statistică:

Datele au fost analizate statistic printr-o analiză unică a varianței (ANOVA) utilizând pachetul software SPSS (IBM Statistics Desktop, V22.0). Testul Tukey cu un nivel de semnificație stabilit la 0,05 a fost utilizat pentru a determina prezența diferențelor semnificative statistic între valorile medii ale scorurilor și procentelor de infiltrare a colorantului materialelor testate.

Rezultatele microinfiltrării evaluată prin metoda scorurilor sunt prezentate în tabelul 4.2, iar rezultatele în procente de infiltrare măsurate de-a lungul interfețelor dentină / adeziv și email / adeziv sunt prezentate în Tabelul 4.3.

Tabelul 4.2
Scorurile de microinfiltrare la smalț și dentină

Materiale (Group)		Scoruri microinfiltrare							
		Dentină				Smalț			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Număr (%) restaurări făcute cu materiale diferite	FL-Bond II / Beautifil II (control) (Grup I)	8 (29)	6 (21)	4 (14)	10 (36)	28 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Sistem adeziv A1/ giomer G (Grup II)	0 (0)	0 (0)	4 (15)	24 (85)	24 (85)	4 (15)	0 (0)	0 (0)
	Sistem adeziv A2/ giomer G (Grup III)	2 (7)	12 (43)	14 (50)	0 (0)	28 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tabelul 4.3

Procentul lungimii de penetrare a colorantului la interfața dinte restaurare
Valori medii (N=28) și (devierea standard)

Materiale (Grup)	Procentul lungimii de penetrare (%)	
	Dentină	Smalț
FL-Bond II/ Beautifil II (control) (Grup I)	23.32 (21.01) ^a	0.00 (0.00) ^a
Sistem adeziv A1/ giomer G (Grup II)	58.15 (18.68) ^{a b}	1.82 (2.54) ^{a b}
Sistem adeziv A2/ giomer G (Grup III)	14.74 (8.43) ^b	0.00 (0.00) ^b

Notă: Literele exponentiale din coloane indică statistic valorile medii semnificativ diferite unul de celălalt, analizate cu testul Tukey, P <0,05.

În tabelul 4.2. se observă că scorurile pentru microinfiltrarea prezentă la marginea în smalț au fost 0 în toate probele investigate, cu excepția a 4 restaurări aparținând grupei II (A1 și giomer G).

La marginea în dentină, probele investigate restaurate cu FL-Bond II și Beautifil II (control, grupa I) au avut toate scorurile în intervalul (0, 1, 2 și 3), în timp ce pentru probele restaurate cu sistemul adeziv A2 și giomerul G (grupa III) scorurile au fost 0, 1 și 2, cu absența celui mai mare scor de microinfiltrare 3. La probele din grupul II s-au găsit scorurile 2 și 3 arătând o microinfiltrare semnificativă prezentă la toate restaurările cu sistemul adeziv A1 și giomerul G

În figura 4.5, sunt prezentate imagini reprezentative de microscopie optică ale feliilor de dinți care prezintă diferite scoruri de microinfiltrare la marginea în smalț și în dentină.

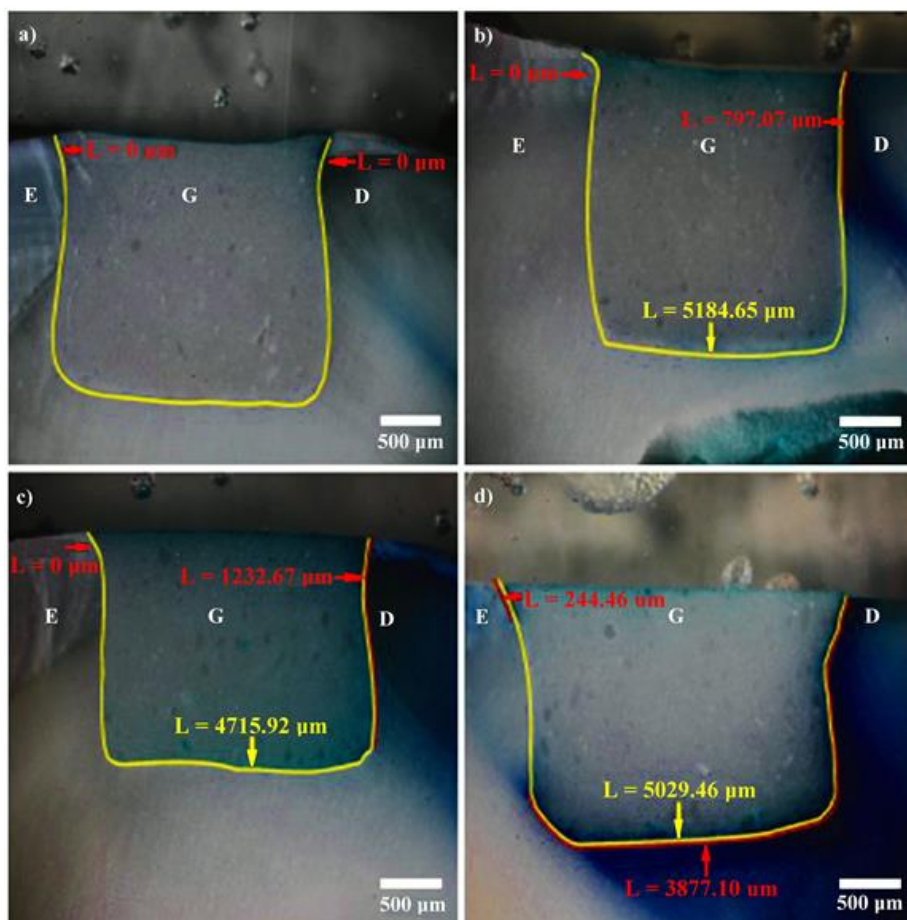


Fig. 4.5. Imagini de microscopie optică ale feliilor de dinți cu scoruri de microinfiltrare diferite la smalț (E) și la dentină(D).

a) 0 (E) și 0 (D) - grupul I; b) 0 (E) și 1(D) - grupul I c) 0 (E) și 2 (D) - grupul III; d) 1(E) și 3 (D) - grupul II.

Linia galbenă- perimetrul cavității (lungimea interfeței)

Linia roșie- infiltrarea colorantului (lungimea interfeței infiltrate)

Rezultatele din tabelul 4.3. care arată procentele de infiltrare atât la dentină cât și la smalț, au fost în concordanță cu rezultatele în scoruri obținute pentru microinfiltrare (tabelul 4.2.) Procentele de infiltrare la dentină pentru restaurările făcute cu adeziv A1 și Giomer G (grupa II) au fost de 2,5 ori mai mari decât cele obținute pentru restaurările realizate cu FL-Bond II și Beautifil II (Control) și aproape de patru ori mai mari decât cele pentru restaurările realizate cu sistemul adeziv A2 și giomerul G (grupa III).

Procentele de infiltrare obținute la dentină pentru restaurările realizate cu adeziv A2 și giomer G(grup III) au fost de 1.5 ori mai mici decât cele obținute pentru restaurările făcute cu FL-Bond II și Beautifil II (Control).

Analiza statistică ANOVA a relevat diferențe semnificative statistic între procentele de infiltrare obținute la marginile în smalț($p=4.626 \times 10^{-6}$) și cele obținute la marginile în dentină ($p=3.701 \times 10^{-15}$). Testul Tukey post-hoc a arătat existența unei diferențe semnificativ statistice între grupul I(control) și grupul II deasemenea între grupul II și grupul III atât la nivelul smalțului cât și la nivelul dentinei. La dentină diferențe semnificative statistic similare au fost observate la compararea grupului II cu grupul III ($p=5.100 \times 10^{-9}$) și la compararea grupului I cu grupul II ($p=5.191 \times 10^{-9}$). La smalț s-au observat aceleași diferențe între grupuri ca și la dentină, comparând grupul I cu grupul II și grupul II cu grupul III s-au observat diferențe semnificative la un prag de semnificatie statistică $0.05(p=3.918 \times 10^{-5})$.

Diferențele înregistrate între grupul I și grupul III nu au fost semnificative statistic la dentină ($p=0.148$) și nici la smalț($p=1.000$).

Diferențele dintre scorurile de infiltrare observate la smalț în comparație cu scorurile obținute la dentină ar putea fi explicate prin diferențele morfologice dintre dentină și smalț. Structura smalțului se bazează pe cristale de hidroxiapatită (Hap) 92% unități de volum, 2% unități de volum materie organică și 6% unități de volum apă [23] . Structura sa permite crearea de microretenții prin gravarea acidă a suprafeței. Acest proces va asigura o interconectare perfectă cu componentele adezivilor, conducând la realizarea unei sigilări bune la interfață. Pe de

altă parte, dentina este mai hidrofilă, cu o structură canaliculară formată din Hap 48% unități de volum., 29% unități de volum materie organică și 23% unități de volum apă [23]. Tubulii dentinari traversează toată dentina, de la joncțiunea smalț-dentină spre pulpa dentară. Chiar dacă dentina este uscată înainte ca sistemul adeziv să fie aplicat, fluidul dentinar reapare, punând aproape în permanență în pericol adeziunea [24]. Această structură a dentinei o face mai susceptibilă la microinfiltrare decât smalțul [25]-[28]

Mecanismul dublu de adeziune la dentină este relativ similar pentru adezivii experimentali și pentru cel comercial (abordarea ușor "auto-gravantă"), adeziunea fiind realizată prin retenție micromecanică și interacțiuni chimice [6]. Când a fost aplicat un primer experimental (PAlk-1-MA sau PAlk-2-MA) pe dentină, acidul polialchenoic a dizolvat stratul de detritus dentinar remanent, a demineralizat parțial dentina și a format legături ionice puternice cu calciu din hidroxiapatită [29],[30]. Demineralizarea dentinei a fost minimă în acest caz deoarece hidroxiapatita a tamponat acidul polialchenoic slab [28]. S-a format astfel o zonă de interacțiune chimică (zona de inter-difuziune, stratul de schimburi ionice) cu o grosime de câțiva micrometri în care sarea de polialchenoat de calciu are solubilitate scăzută [6]. După aplicarea adezivului propriu-zis (bondingului) și fotopolimerizarea acestuia, datorită grupărilor metacrilice grefate, acizii polialcenoici au fost capabili să polimerizeze cu TEGDMA și HEMA din primer și cu monomerii din adezivul propriu-zis, conducând la formarea unei rețele polimerice unice de adeziv.

Prin aplicarea primerul din sistemul adeziv autogrant FL Bond II, s-a produs infiltrarea monomerilor acizi și demineralizarea parțială a dentinei, creând micro-porozitățile pentru retenția micro-mecanică [31]. Un strat hibrid de grosime mică este format prin infiltrarea monomerilor în rețeaua de fibre de colagen acoperită cu hidroxiapatită. Au apărut suplimentar interacțiuni chimice între monomerii acizi (4-AET și 6-MHPA) și ionii de calciu din hidroxiapatita reziduală [32]. Cu toate acestea, este posibil ca sarea de calciu a 4-AET (Ca-4AET) să aibă o solubilitate relativ ridicată așa cum și sarea de calciu a acidului trimelitic 4-metacriloxietil (Ca-4MET) are o solubilitate crescută, nefiind astfel foarte stabilă [33]

Diferențele de microinfiltrare apărute între grupurile experimentale (II și III) pot fi explicate prin luarea în considerare a compoziției chimice a primerilor. Cele două sisteme adezive (A1, A2) conțin doi primeri diferiți (primerul 1 și primerul 2) în care principalele componente au fost acizi polialcenoici modificați cu grupări polimerizabile (PAlk-1-MA și

respectiv PAlk-2-MA) și adezivul propriu-zis bazat pe Bis-GMA. Acidul polialchenoic cu grupări (fragmente) de aminoacizi pendante (PAlk-2-MA) a prezentat o mai mare flexibilitate, permițând mai multă libertate și o împiedicare sterică redusă atunci când grupurile carboxilice au interacționat cu ionii de calciu din hidroxiapatita dentară [31] , [33] . Ca o consecință, mai multe grupuri carboxilice au interacționat cu ionii de calciu din țesuturile dentare în cazul PAlk-2-MA din primerul 2 în comparație cu PAlk-1-MA din primerul 1. În plus, deoarece PAlk-1-MA a prezentat gradul de funcționalitate a grupărilor carboxilice cu fragmente metacrilice de aproximativ 10 ori mai mare decât cele ale PAlk-2-MA (20% față de 2,5%), numărul de grupări carboxilice libere care ar putea interacționa cu Ca^{2+} din hidroxiapatită a fost mult mai mare pentru PAlk- 2-MA. Acest comportament a dus la îmbunătățirea etanșeității și adeziunii atunci când se utilizează PAlk-2-MA (primerul 2). Conținutul de resturi de L-leucină a PAlk-2-MA, adică grupări amidă (-CO-NH-), poate deasemenea conduce la formarea de legături de hidrogen suplimentare cu grupările carboxilice ale colagenului. [33]

SEM și AFM folosite în continuare pentru investigarea interfeței de adeziune, sunt instrumente puternice pentru investigarea suprafețelor diferitelor tipuri de probe (de exemplu, nanoparticule, bio nanocompozite, biomateriale) [34]–[36] [21] . Investigația AFM a fost efectuată în modul contact intermitent ("tapping") pentru a caracteriza interfața dinte/restaurare prin dezvăluirea topografiei sale.

Fig. 4.6 a și 4.6 b arată imagini SEM ale dentine tratate cu sistemul adeziv A2 și giomer G. Fig. 4.6 c și 4.6 d prezintă imagini la interfața dentinei cu adezivul FL Bond II și giomerul Beautifill II.

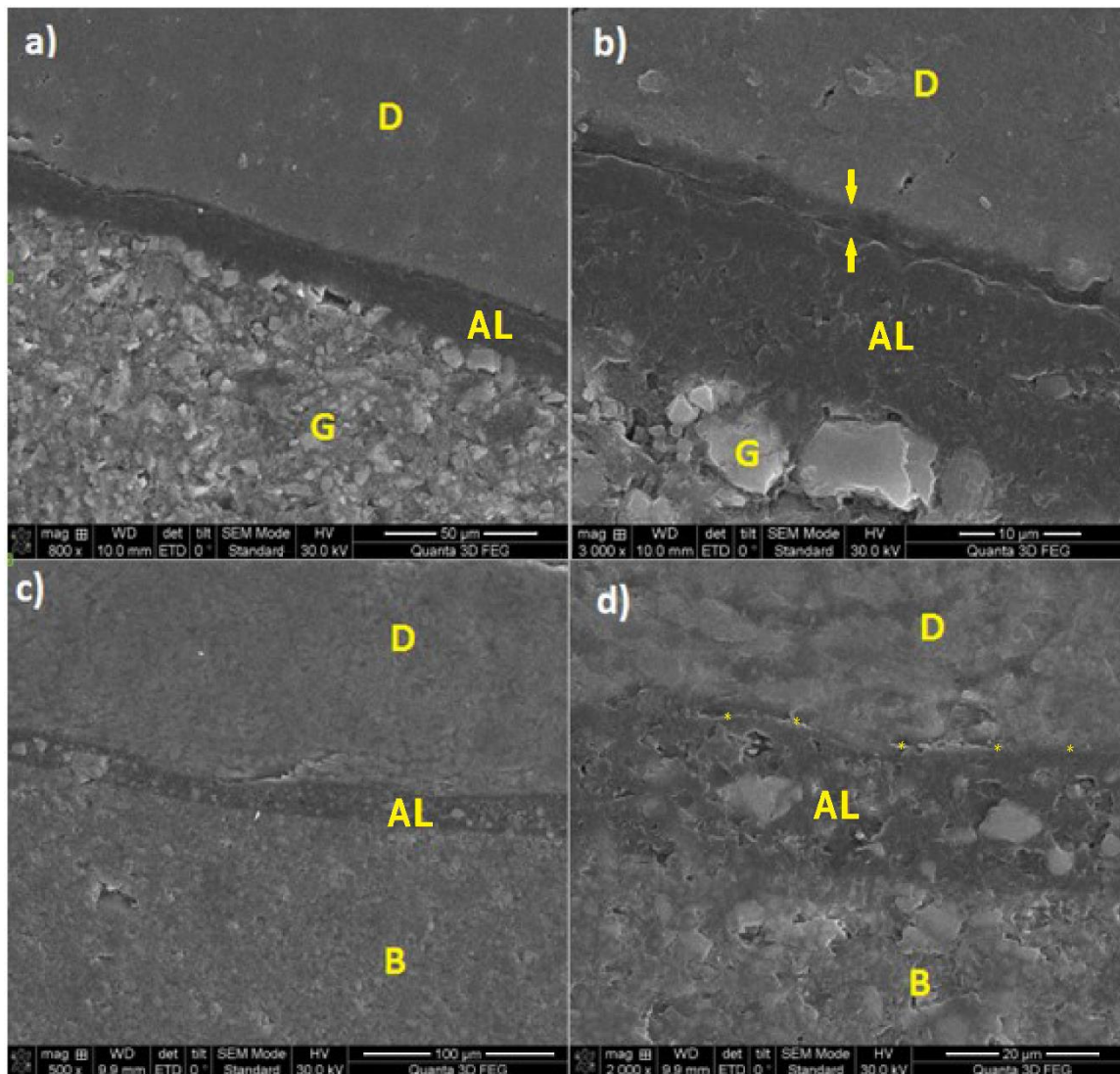


Fig. 4.6 Imagini SEM la interfața: a), b) dentină / adeziv A2 / Giomer G ; c, d) dentină / FL Bond II / Beautifil II.

Săgețile arată marginile stratului de schimburi ionice

Steluțele arată interfața de adeziune la dentină

(D) - dentină; (AL) – stratul de adeziv ; (B) - Beautifil II; (G) - Giomer G

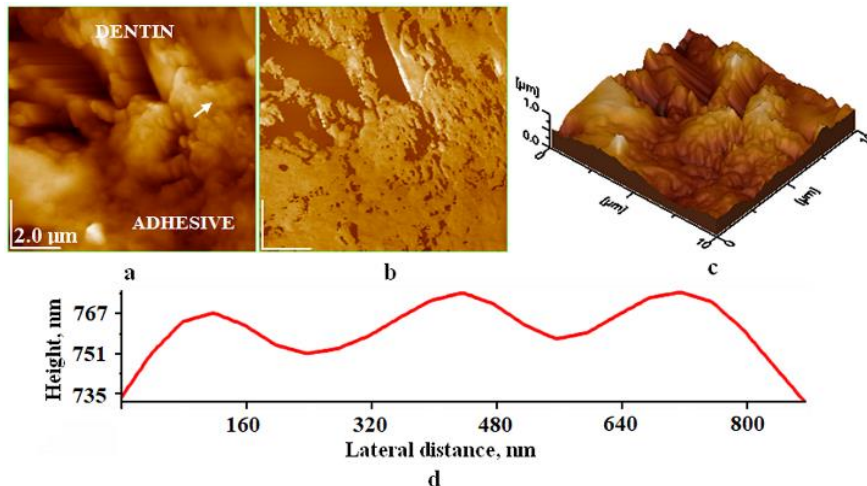


Fig. 4.7. Imaginile AFM obținute la interfața de adeziune dintre dentină / sistemul adeziv A2/Giomer G; a) imagine topografică, b) imaginea de fază, c) viziune 3D –a imaginii (a), și d) secțiune transversală pe săgeata albă din figura (a). Zona scanată 10 μm x 10 μm

În Fig. 4.7 sunt prezentate imaginile AFM la interfața de adeziune dentină/sistem adeziv A2 /giomer G .

În figurile 4.6 a și 4.16 b se poate observa capacitatea bună de sigilare a sistemului adeziv A2 atât la interfața cu dentina cât și cu giomerul G. Dentina prezintă o suprafață netedă plină de puncte mici reprezentând tubulii dentinei. Detaliile microstructurii din figura 4.6 b dezvăluie interfața de adeziune cu dentina la o rezoluție mai mare. Stratul de schimb ionic a variat de la 1 la 2 μm. Stratul de adeziune cu o grosime de aproximativ 10 μm poate fi observat între stratul de schimb ionic și giomerul G. Giomerul G are o microstructură heterogenă bazată pe o materie granulară cu forme poliedrice. O cantitate mare de particule care măsoară mai puțin de 10 microni cu muchii ascuțite sau rotunjite, precum și câteva particule având un diametru de aproximativ 20 microni pot fi vizualizate în figura 4.6 b. Bazându-se pe analiza dimensiunii particulelor, prima poate fi atribuită particulelor de umplutură radiopacă sau particulelor mici SPRGexp, iar a doua poate fi atribuită particulelor de umplutură SPRGexp de mari dimensiuni [37]

Interfața de adeziune (stratul hibrid) dintre dentină și Beautifil II apare ca un strat ondulat, urmărind îndeaproape marginea dentinei și având aproximativ aceeași lățime de-a lungul interfeței (fig.4.6 c, 4.6 d). Grosimea stratului adeziv a variat de la 18 la 20 μm, iar

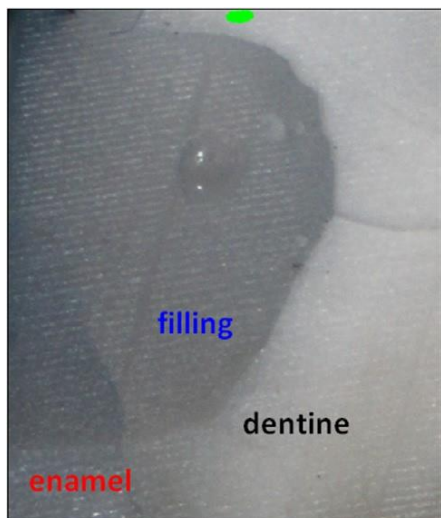
particulele de umplutură SPRG au prezentat forme de poliedre neregulate cu dimensiuni de la 5 la 15 μm . Morfologia zonei de adeziune este mai bine observată la mărire superioară în figura 4d. A fost stabilită o bună legătură între adeziv și restaurarea de giomer. Morfologia de suprafață a lui Beautiful II prezintă particule de mărimi diferite, cele mai multe sub 15 micrometri, având forme neregulate. Se observă de asemenea o cantitate mai mare de particule încorporate în matricea polimerică decât în cazul giomerului experimental. Porii negri de pe suprafața probelor din imaginile SEM ale giomerilor au apărut datorită pregătirii probelor (tăiere și șlefuire) când particulele de diferite mărimi pot fi separate de matricea polimerică.

Morfologia interfeței de adeziune dintre dentină / adeziv A2 /giomerul G este observată și în imaginile AFM (Figura 4.7) la mărire mare. Dentina este situată în partea de sus a imaginii topografice din Figura 4.7 a și adezivul este situat în partea inferioară a imaginii. Stratul de schimb ionic format de reacția dintre acid polialchenoic și hidroxiapatita din dentină are o grosime de aproximativ 2 μm . Topografia acestui strat dezvăluie nanostructura sa care conține nano-particule cu diametrul mediu de aproximativ 80 nm, așa cum se observă în secțiunea transversală din Figura 4.7 d. Aceste unități nanostructurale pot fi atribuite hidroxiapatitei reacționate cu acid polialchenoic. Se observă o bună sigilare a tubului dentinar și se obține o îmbinare optimă între dentină și sistemul adeziv. Faptul este susținut și de imaginea de fază, Figura 4.7 b, în care dentina, stratul de schimburi ionice și adezivul apar ca un singur bloc solid având nuanțe de culoare brun deschis, în timp ce tubul dentinar este prezentat în maro închis. Imaginea tridimensională a imaginii topografice, figura 4.7 c, prezintă adeziunea obținută cu adezivul A2 într-o manieră mai sugestivă, stratul de schimburi ionice într-o bună îmbinare cu dentina este mai bine observat.

Imaginile SEM și AFM sunt în acord cu rezultatele obținute prin metoda de penetrare a colorantului, arătând că sistemul adeziv A2 asigură sigilarea eficientă a restaurărilor de giomer G.

Pentru completarea informațiilor cu privire la investigarea interfeței de adeziune la probele selectate s-a folosit *metoda termografiei de detecție sincronă*.

Această metodă este exemplificată mai jos pe o restaurare aparținând grupului III realizată cu giomer G și sistemul adeziv experimental A2.



În figura 4.8 se prezintă imaginea optică a probei 2 (cavitate restaurată cu giomer G și sistemul adeziv A2 aparținând grupului III). Nu s-a detectat nici o urmă de colorant la interfața restaurare/dinte, ceea ce indică o bună adaptare marginală. Pentru a evalua integritatea acestei restaurări interne, s-au efectuat investigațiile probei prin termografie.

Fig.4.8. *Imaginea optică a probei 2 (cavitate restaurată cu giomer G și sistemul adeziv A2)*

Imaginile obținute prin termografia de detecție sincronă sunt afișate în figurile 4.9 (a) - (f). Poziția sursei de căldură este indicată în figura 4.8 de către punctul localizat aproape de interfața restaurare/ dentină. Figurile 4.9 (a) și (b) reprezintă imaginea DC și profilul de-a lungul liniei marcate, care sunt destul de perturbate. Deoarece dentina prezintă numeroși tubuli dentinari, fasciculul laser este împrăștiat în țesutul dentinar, iar punctul de excitație este extins pe suprafață. Când lumina ajunge la interfața dintre dentină și restaurare, este parțial refractată, reflectată și împrăștiată. În funcție de proprietățile optice ale materialului de restaurare și ale dentinei, lumina poate fi absorbită preferențial de către o parte a interfeței, asigurând o sursă suplimentară localizată de căldură. Un semnal IR crescut se observă în apropierea marginii dintelui, comparativ cu regiunea de excitație (a se vedea figura 4.9 (a)).

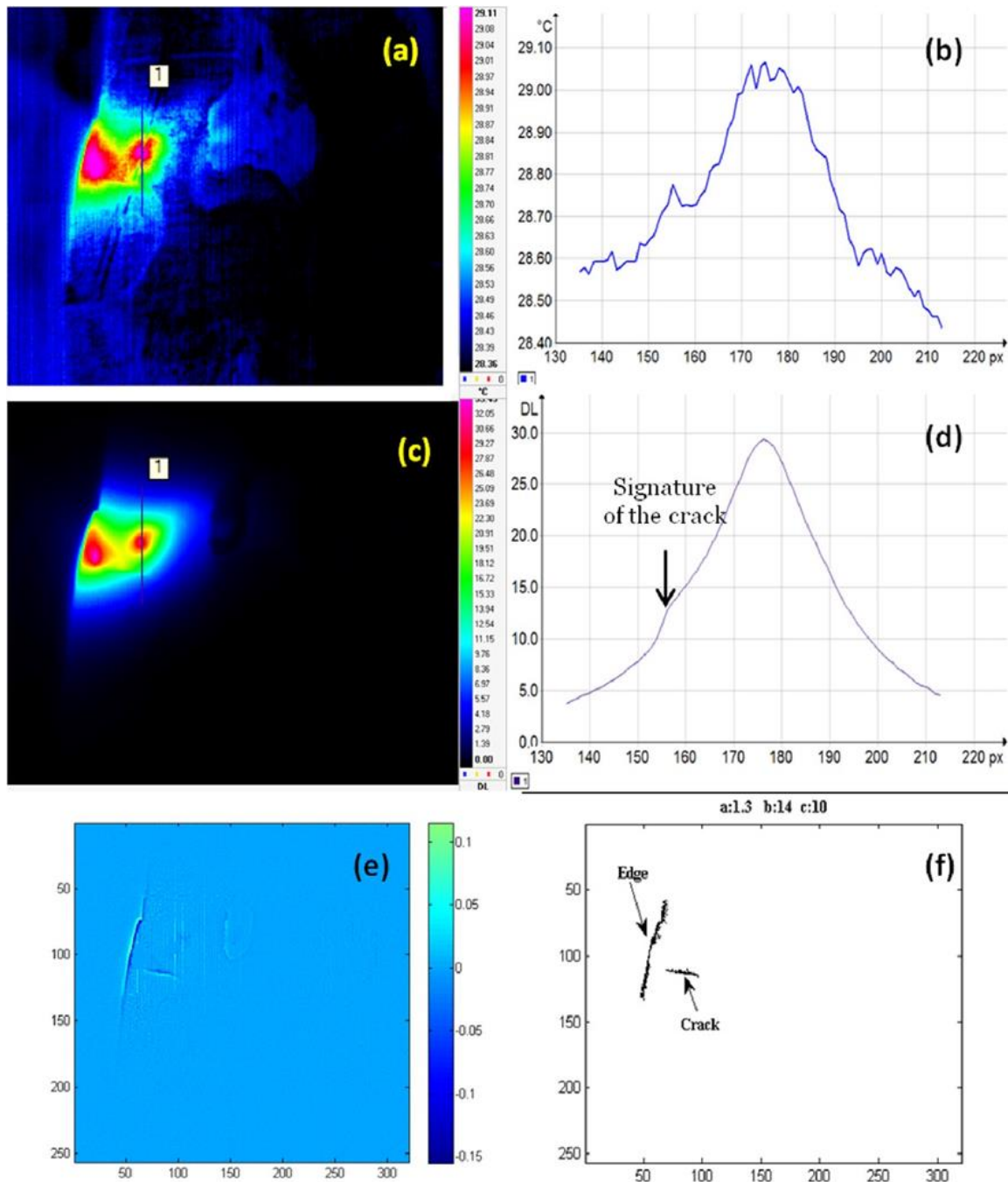


Fig.4.9. (a) *Imagina DC a probei 2.* (b) *Profilul imaginii DC de-a lungul liniei marcate.* (c) *Imagina de amplitudine.* (d) *Profilul imaginii de amplitudine de-a lungul liniei marcate.* (e) *imaginea Mb (x, y).* (f) *Imagina binară rezultată.*

Imagina de amplitudine cu profilul corespunzător de-a lungul liniei marcate este prezentată în figurile 4.9 (c) și (d). Perturbarea undelor termice datorită prezenței unei

discontinuități este vizibilă la coordonatele $x = 158$. Imaginile binare $M_b(x, y)$ rezultate după aplicarea algoritmului de procesare a imaginii sunt prezentate în figurile 4.9 (e) și (f). Se detectează un defect la interfața restaurare-dentină, aproape de zona excitată. Lungimea fisurii (crack-ului) detectat este de aproximativ $700 \mu\text{m}$ (23 pixeli).

Dintre cele două sisteme adezive inovatoare (A1 și A2) dezvoltate pentru restaurările dentare în scopul reparării leziunilor carioase din smalț sau dințină folosind protocoale clinice adecvate, sistemul adeziv A2 care conține acid polialchenoic modificat PAlk-2-MA a condus la o sigilare îmbunătățită la interfața cu dentina și la o adeziune perfectă la interfața cu smalțul în restaurările dentare cu giomer. Constatările noastre sugerează că microinfiltrarea în restaurările cu giomeri poate fi redusă prin utilizarea unui adeziv în doi timpi pe bază de ionomeri de sticlă modificați cu rășină, care conține un acid polialchenoic cu greutate moleculară relativ ridicată având o formulă chimică specifică care include resturi de L-leucină și grupări metacrilice fotopolimerizabile. Rezultatele descrise mai sus arată că compoziția sistemelor adezive influențează sigilarea, adeziunea și legarea giomerului de țesutul dintelui.

Testul de penetrare a coloranților permite doar detectarea lipsei de continuitate la marginile restaurării iar SEM și AFM pot fi folosite doar *ex vivo*, fiind metode de investigare invazive în medicina dentară. Termografia de detecție sincronă prezintă cele mai promițătoare rezultate, în special datorită potențialului său de a funcționa *in vivo*, datorită caracterului său neinvaziv și datorită capacității sale de a detecta atât defectele marginale, cât și interne, localizate în cavitățile dentare restaurate cu diverse materiale. Inspectarea termografică se poate face în câteva minute. Acest studiu realizat pe secțiuni transversale *ex vivo* ale dinților cu restaurări de giomer demonstrează prezența unui contrast fototermic la nivelul fisurilor. Utilizarea celui de-al doilea derivat al algoritmului de prelucrare a amplitudinii și a imaginii îmbunătățește calitatea imaginilor rezultate, sporind semnătura fisurilor de pe suprafață. Procedura propusă duce la diagnosticarea fisurilor apărute la interfață având lățimi de aproximativ $1 \mu\text{m}$.

4.4. Studiu comparativ al performanței giomerilor de sigilare

Doi giomeri experimentali de sigilare fotopolimerizabili au fost preparați S12, S22 prin amestecarea în matricea de rășină a unei umpluturi hibride în raport de 1:1 (Capitol 2). Sigilarul Fissurit F Vocco GmbH (FS) a fost folosit ca și control. Zece dinți indemni de carie (extrași în scop ortodontic sau de cauză parodontală) au fost sigilați pe suprafața ocluzală cu fiecare

material (S11, S12, FS). Au fost înglobați apoi în acrilat și secționați longitudinal în felii de aproximativ 2 mm folosind un microtom cu disc diamantat (Isomet 1000, Buehler, SUA) cum e exemplificat în fig. 4.10

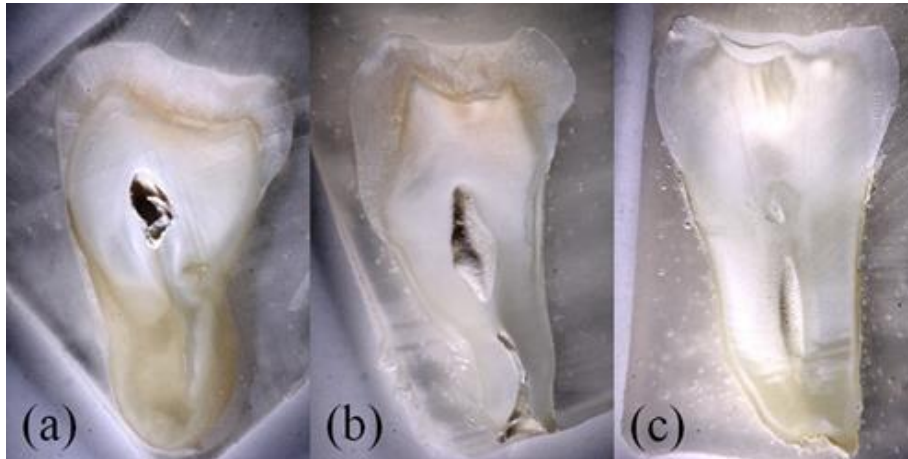


Fig.4.10. Secțiuni de dinți sigilate cu S11 (a), S12 (b) și Fissurit FS (c) și încorporate în PMMA

Feliile aparținând fiecărui grup au fost examinate la microscopul optic, SEM și cu ajutorul termografiei de detecție sincronă. Determinările la microscopia electronică de baleiaj au fost efectuate pe un microscop INSPECT S , (FEI Co).

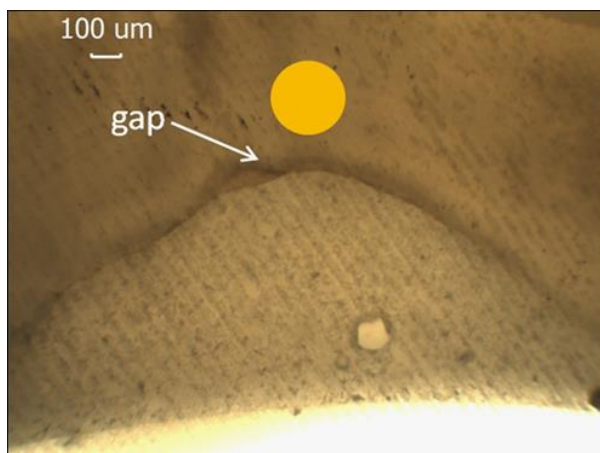


Fig.4.11. Imagine optică a probei S22

O imagine optică a probei S22 este prezentată în figura 4.11. Se poate observa prezența unui gol la interfața material de sigilare /smalt. Același procedeu de detectare sincronă a fost aplicat și pe acest specimen (sursa de căldură este desenată în figura 4.11. prin punctul situat în apropierea interfeței investigate). În acest caz, debitul de căldură este perturbat la interfața material de sigilare / smalt, așa cum se poate observa clar în imaginile de amplitudine și de fază (vezi figurile 4.12 și 4.13).

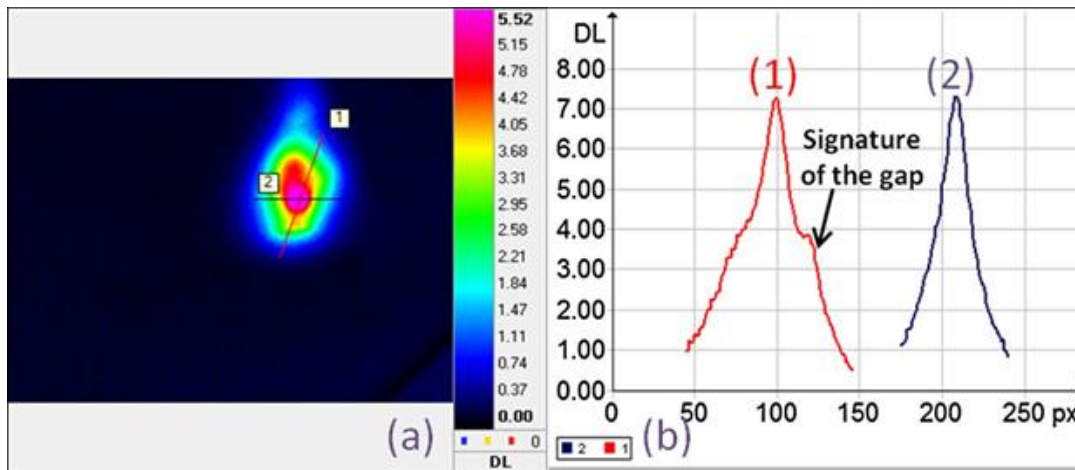


Fig. 4.12. *Imagina de amplitudine (a) și profilele corespunzătoare (b).*

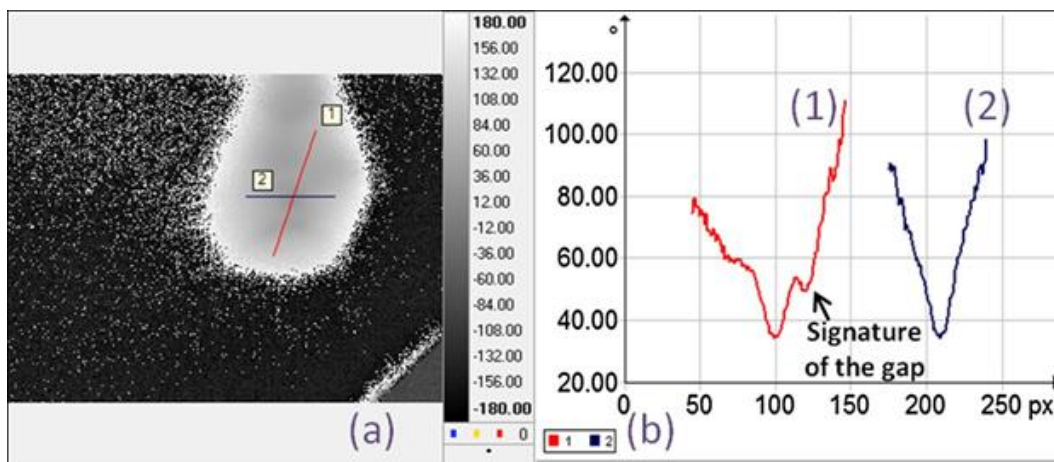


Fig.4.13. *Imagina de fază (a) și profilele corespunzătoare (b).*

Ambele imagini de amplitudine și de fază oferă informații despre localizarea pe suprafață a fisurii. Perturbarea undelor termice deasupra defectului este semnul unei întârzieri de propagare în comparație cu un semnal de referință (a se vedea figura 4.13b) sau o mică perturbație a amplitudinii deasupra zonei cu defect în comparație cu smalțul sănătos. (vezi figura 4.12b). Fisura acționează ca o barieră termică perturbând difuzia căldurii. Pentru a putea fi detectată, fisura trebuie să fie localizată în zona de difuzie a căldurii. Așa cum se poate vedea în fig. 4.12 și 4.13, întreruperea undelor termice este mai mare în imaginea de fază decât în imaginea de amplitudine. Pentru a evidenția variațiile de temperatură mici din jurul fluxului, se

aplică al doilea derivat spațial al imaginii de amplitudine. În acest fel, contrastul dat de prezența unui decalaj la interfață este îmbunătățit și mai multe caracteristici devin vizibile. Fluctuațiile irelevante din zona de acțiune a laserului au fost filtrate, folosind o mască. Conturul decalajului este puțin vizibil, așa cum se poate vedea în figura 4.14.

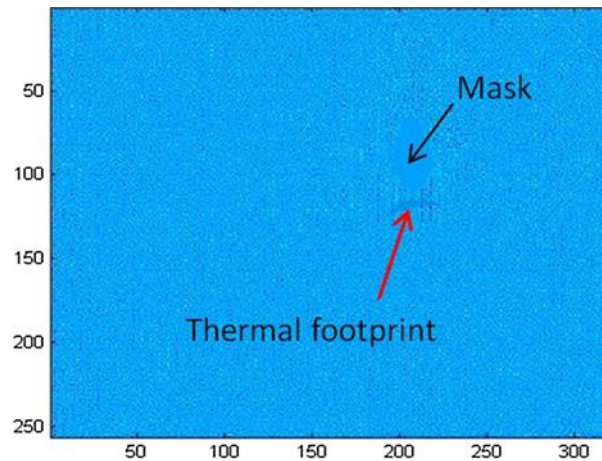


Fig. 4.14. *Imaginea de amplitudine îmbunătățită.*

Cu toate acestea, prin aplicarea algoritmului de procesare a imaginii descris anterior [38] imaginea binară în care se vede semnătura fisurii de suprafață nu poate fi generată cu suficientă precizie. Pentru a îmbunătăți rezultatele, aplicăm pe imaginea de fază al doilea algoritm de procesare a imaginii (figura 4.15 a). Imaginea de fază îmbunătățită IT este prezentată în figura 4.15 b și Laplacianul fazei îmbunătățite $r_2 I T$ din figura 4.15c. Imaginea binară rezultată (figura 4.15 d) arată în mod clar prezența unei fisuri cu o lungime de 50 μm , localizat la interfața material de sigilare / smalț. O mică fractură în structura smalțului poate fi, de asemenea, detectată (vezi linia oblică din figura 4.15 d).

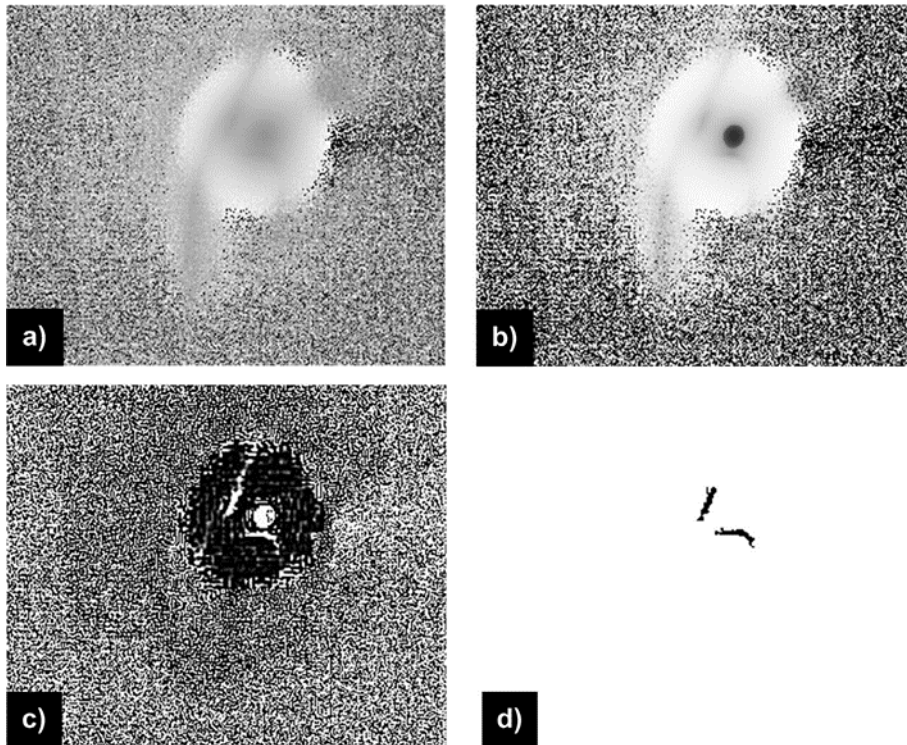


Fig.4.15. *Imaginea de fază (a), imaginea de fază îmbunătățită IT (b), Laplacian de fază îmbunătățită $r2IT$ (c) și imaginea binară rezultată (d).*

Cele două materiale de sigilare selectate S12, S22 și investigate din punct de vedere al adeziunii lor la smalț au avut rezultatele obținute similare cu cele ale produsului comercial Fissurit F. Rezultatul ideal s-a obținut cu giomerul de sigilare S12 care a realizat o sigilare perfectă la smalț cu o bună adaptare la anatomia fisurilor ocluzale.

Capitol 5. Evaluarea biocompatibilității materialelor

Biocompatibilitatea este una dintre cele mai importante proprietăți ale materialelor dentare și în acest capitol am descris metode de investigare a biocompatibilității aplicate ulterior pe materialele experimentale de tip giomer.

5.1. Metode de evaluare a biocompatibilității *in vitro*

Pentru determinarea biocompatibilității *in vitro*, metodele de testare recomandate includ: teste direct pe culturi celulare și pe extract de culturi celulare; test de difuziune Agar; test difuziune prin filtre și testarea cu barieră dentinară. În literatura de specialitate există în prezent un număr crescut (aproape 20) de tehnici de cultură celulară. [39]

5.2 Metodă de evaluare a biocompatibilității

Conform normelor EUROTOX, CEE, FDA și Ord. MS 949/1991 pentru materialele de reconstrucție dentară utilizate în stomatologie se optează pentru testul de toleranță prin implantare a produselor

Testul de implantare pentru aceste produse poate fi practicat pe o specie de animale de laborator, șobolani de diferite rase în două variante: implantare subcutanată și implantare intramusculară.

Toate animalele selecționate trebuie să fie sănătoase, cu stare fiziologică normală și pe toată durata experimentului trebuie să li se asigure condiții de întreținere și alimentație standard.

5.3 Evaluarea citotoxicității și biocompatibilității giomerilor

S-a testat biocompatibilitatea giomerului de restaurare experimental G notat mai departe (A1) selectat pentru proprietățile sale testate anterior și giomerul de sigilare S12 (notat S) selectat anterior dintre giomerii de sigilare experimentali preparați. S-au preparat deasemenea încă 2 giomeri de restaurare cu HEMA și Bis-GMA respectiv cu HEMA și UDMA. Compoziția lor este prezentată în tabelul 5.1.

Tabelul 5.1. Compoziția giomerilor testate în prezentul studiu

Giomer	Compoziția giomerilor			
	Monomer principal	Monomeri de diluție	Sistem de activare a fotopolimerizării	Umplutura
Giomer S	Bis-GMA (32.82%)	TEGDMA (21.89%)	CQ (0.1%) DMAEMA (0.19%)	PRG2 (9%) F-HA (9%) Sticla bariu- fluoro-alumino-boro-silicatica (27%)
Giomer A1	Bis-GMA (13.82%)	TEGDMA (5.89%)	CQ (0.1%) DMAEMA (0.19%)	PRG2 (28%) F-HA (12%) Sticla bariu- fluoro-alumino-boro-silicatica (40%)
Giomer A2	Bis-GMA (13.82%)	HEMA (5.89%)	CQ (0.1%) DMAEMA (0.19%)	PRG2 (28%) F-HA (12%) Sticla bariu- fluoro-alumino-boro-silicatica (40%)
Giomer A3	UDMA (13.82%)	HEMA (5.89%)	CQ (0.1%) DMAEMA (0.19%)	PRG2 (28%) F-HA (12%) Sticla bariu- fluoro-alumino-boro-silicatica (40%)
Giomer Beautifil II*	Bis-GMA (7.5%)	TEGDMA (<5%)	DL-CQ	SPRG comercial Sticla alumino-fluoro-boro-silicatica (70%) Al ₂ O ₃

*Material Safety Data Sheet, Beautifil II, <http://www.net32.com/images/prodinfo/a/shofu-dental-corp-beautifil-ii-compule-tips-b1-20-pk-1759.pdf>

Abbreviations: %: percentage by weight;

Test de evaluare a citotoxicității:

Culturi celulare:

Au fost folosite fibroblaste dermice umane HDFa (Invitrogen, Willow Creek, SUA) și culturi de celule endoteliale umane din venele cordonului ombilical HUVEC (Promocell, Hamburg, Germania). Fibroblastele s-au cultivat în mediu Dulbecco modificat Eagle (DMEM), în timp ce culturile HUVEC s-au cultivat în mediu RPMI, ambele suplimentate cu ser fetal de vițel 5%, gentamicină 50 ug / ml și amfotericină 5 ng / ml (Biochrom Ag, Berlin, Germania).

Extractele de biomateriale au fost obținute în conformitate cu standardul ISO 10993-12: 2012. O probă subțire (0,5-1 mm) din fiecare suprafață de material $\approx 3 \text{ cm}^2$ a fost incubată, scufundată complet în 1 ml mediu de cultură timp de 24 și 72 de ore la 37° C . Șase probe au fost incubate pentru fiecare compoziție de giomer. Extractele au fost folosite imediat pentru testele de viabilitate celulară.

Testele de viabilitate celulară:

Celulele însămânțate la o densitate de 104 / godeu în plăci de microtitruare cu fund plat cu 96 de godeuri ELISA (TPP, Elveția) au fost lăsate să se depună timp de 24 de ore. Celulele au fost expuse timp de 24 de ore direct la extractele din fiecare probă de biomaterial (preparată ca mai sus) diluată într-un interval de 1-0.001 în mediu de cultură celulară. Celulele au fost apoi spălate și viabilitatea a fost măsurată prin măsurarea colorimetrică a formazanului, un compus colorat generat de celule viabile utilizând testul de proliferare celulară CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, SUA).

Culturile netratate expuse la mediu au fost utilizate ca martori. Pe scurt, celulele au fost expuse la 20 μl de a 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazoliu, amestec de sare internă (MTS)/ fenazină metosulfat (PMS) (2 ml: 100 μl) în 100 μl mediu proaspăt / godeu, timp de 2 ore, apoi valorile densității optice au fost testate la absorbție de 490 nm cu un cititor de plăci ELISA (Tecan, Elveția). Rezultatele sunt prezentate ca OD490

Metoda statistică

Semnificația statistică a diferenței în viabilitatea celulară dintre materialul comercial Beautiful II și materialele experimentale a fost evaluată prin Student TTEST, utilizând GraphPad; rezultatele au fost considerate semnificative pentru $p \leq 0,05$ (nivelul de semnificație $\alpha = 0,05$). Pachetul statistic Prism versiunea 4.00 pentru Windows, GraphPad Software, San Diego, California, Statele Unite ale Americii, www.graphpad.com a fost folosit pentru analize de date. Semnificația statistică a diferenței în citotoxicitate între grupurile tratate și martor a fost, de asemenea, evaluată folosind aceeași procedură.

Pregătirea probelor pentru implantare

Testarea *in vivo* a fost realizată în conformitate cu cerințele Comitetului de etică al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca. Prepararea și implantarea probelor au fost efectuate în conformitate cu standardul (ISO 10993) [40]. Materialele pentru implantare s-au obținut din monopastă fotopolimerizabilă din care s-au format implante sub formă de bastonașe. Bastonașele au avut diametrul de 1,5 mm și lungimea de 5 mm cu marginile rotunde și s-au fotopolimerizat timp de 40 de secunde utilizând lampa Spectrum 800 (Dentsply, Germania) cu 470 nm lungime de undă. După priza materialelor, probele au fost finisate și lustruite folosind sistemul de finisare și lustruire Super Snap (Shofu, Japonia), fără a le modifica consistența sau duritatea. Probele au fost preparate folosind Beautiful II și giomeri experimentali: S și A1 pentru a fi implantate subcutanat (în țesutul subcutanat dorsal) și intramuscular (mușchiul gluteal) la 15 exemplare de șobolani rasa Wister (5 specimene /grup) sub anestezie. După 30 de zile, șobolani au fost eutanasiați, urmând protocoalele Comisiei de Etică, cu o supradoză de anestezie (ISO 10993). S-au prelevat probe de la fiecare specimen și au fost analizate macroscopic și microscopic, iar răspunsul a fost evaluat. Locul implantului a fost ras și probe din țesuturile din zona implantului au fost excizate cu grijă și transferate în formalină 10% timp de 5 zile de fixare și apoi înglobate în parafină. Secțiunile histologice au fost apoi tăiate la 4 μm și colorate cu hematoxilină-eozină. Secțiunea cea mai reprezentativă a fost evaluată. S-au evaluat microscopic numărul și tipul celulelor inflamatorii găsite, prezența unor noi vase de sânge, edemul, necroza și prezența sau absența unei capsule fibroase (evaluarea procesului de reparare). Inflamația la locul implantului a fost cuantificată prin scoruri [41] în funcție de criteriile menționate mai sus și în conformitate cu standardele ISO-10993 : [40]

0 – infiltrat absent: nici un semn de inflamație

1 – infiltrat ușor: 1-5 celule inflamatorii de fiecare tip / hpf [x 400], proliferare capilară minimă (1-3 muguri), fără edem, capsulă dezvoltată timpuriu

2 – infiltrat moderat: 5-10 celule inflamatorii de fiecare tip / hpf [x 400], grupuri de 4-7 capilare cu structuri fibroblastice de susținere, edeme ușoare, capsulă parțial formată

3 - severe: infiltrat inflamator abundent > 20 celule / hpf [x 400], bandă largă de capilare cu structuri fibroblastice de susținere , edem sever, capsulă complet formată.

Au fost însumate scorurile acordate pentru fiecare criteriu în parte și rezultatele arată biocompatibilitatea fiecărui material testat:

- Non-iritant (0.0 – 2.9)
- Ușor iritant (3.0 – 8.9)
- Iritant moderat (9.0 – 15.0)
- Iritant sever (<15)

Rezultate test de viabilitate celulară: in vitro

Toate biomaterialele testate au prezentat o scădere a viabilității celulare strâns legată de doză, în ambele linii celulare testate (fig.5.1). Acest efect a fost, de asemenea, influențat de timpul de preparare a extractului, în principal cu extracte nediluate. Biomaterialele experimentale au prezentat rezultate similare și / sau mai bune comparativ cu cel comercial, acest efect fiind menținut în toate condițiile testate (fig.5.1).

Atunci când a fost utilizat extractul nediluat, toate biomaterialele au scăzut semnificativ viabilitatea celulară în comparație cu martorii. Viabilitatea generală a fibroblastelor (fig.5.1a, b) a fost mai mult afectată comparativ cu cea a HUVEC (fig.5.1c, d). Acest lucru ar putea fi explicat prin faptul că fibroblastele sunt celule adulte, cu capacități proliferative și regenerative reduse, ceea ce le face mai potrivite pentru testarea biomaterialelor [42], [43]HUVEC, care sunt celule fetale, au prezentat rezultate mai bune.

Pentru analiza statistică, OD490 a fiecărui grup experimental, a fost comparat pentru intervalul de timp respectiv, cu martorul netratat. Celulele expuse la materialul comercial,

Beautiful II au prezentat o scădere mai puternică a viabilității după 24 ore ($p \leq 3,73E-10$), față de 72 de ore ($p < 3,57E-09$ pentru fibroblaste, $p = 3,31E-01$ pentru HUVEC) comparativ cu martorii.

Materialele experimentale au avut un efect diferit. Ele au indus o scădere mai importantă a viabilității celulare după 72 de ore ($p \leq 2,62E-07$ pentru fibroblaste și $p \leq 7,79E-05$ pentru HUVEC) decât pentru 24 ore ($p \leq 4,73E-06$ pentru fibroblaste și $p \leq 3,74E-05$ pentru HUVEC), cu toate acestea, $p = 1,1E-01$, nu este semnificativ pentru A1) comparativ cu martorii.

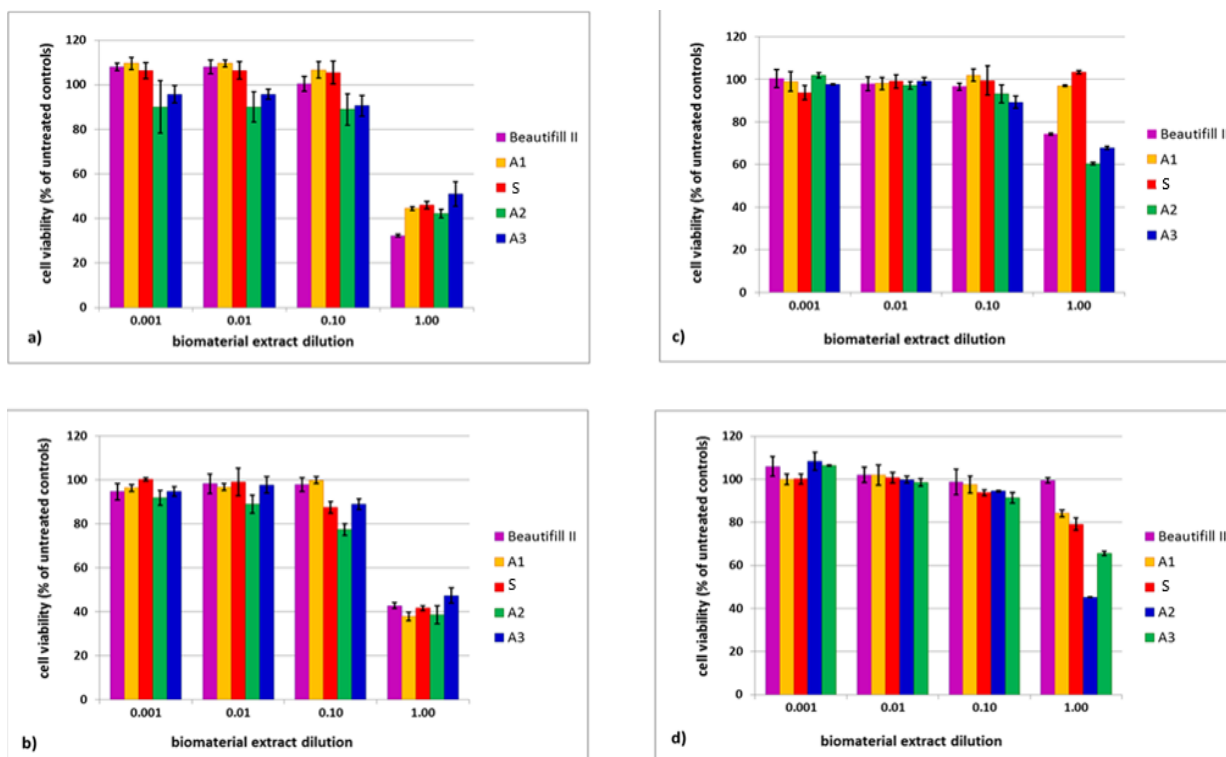


Fig.5.1 Viabilitatea comparativă a fibroblastelor după 24 de ore (a) și după 72 de ore (b) de la expunerea la extracte de giomer și respectiv a HUVEC după 24 de ore (c) și după 72 de ore (d) de la expunerea la extracte de giomer,

Acest lucru se datorează, probabil, proprietăților fizico-chimice ale compușilor care au permis o eliminare mai rapidă a substanțelor toxice în mediu în cazul utilizării materialului comercial, dar a necesitat un timp de contact mai îndelungat pentru materialele experimentale.

Ca o prezentare generală, biomaterialele mai puțin toxice pe cele două linii celulare normale testate au fost S și A1, în timp ce A2 și A3 au prezentat rezultate similare cu produsul comercial, Beautiful II.

Testele de implantare: in vivo

După implantare nu au apărut modificări în starea sau comportamentul general al șobolanilor, ambele tipuri de implanturi: subcutanat și intramuscular au fost bine tolerate, vindecarea postoperatorie s-a realizat fără complicații

Infiltratul inflamator a fost observat în toate trei grupurile în țesutul din jurul implantului, însă fără urme de necroză.

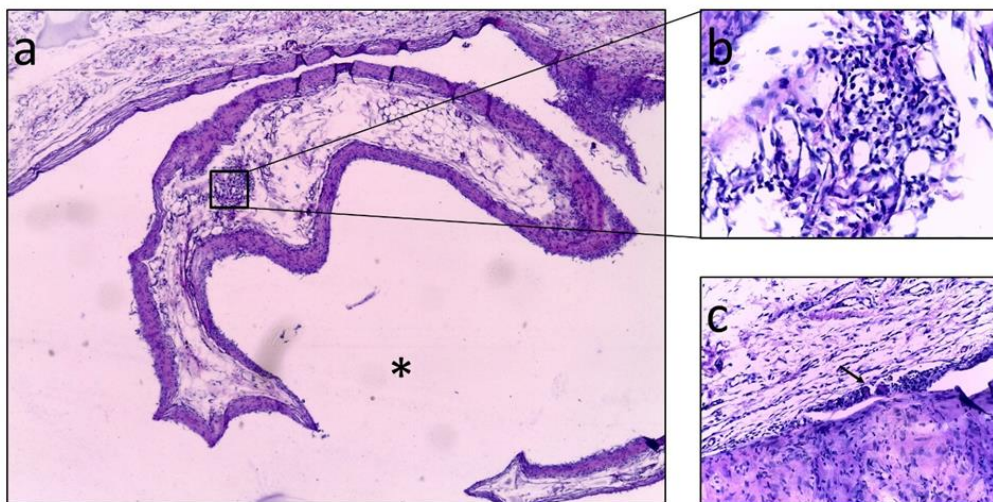


Fig.5.6 *Implant subcutanat cu giomer A1*

* - *Spatiul in care s-a aflat materialul implantat*

a – Magnificatie 4x – imagine de ansamblu – capsula fibroconectiva constituita in proximitatea implantului ;

b – Magnificatie 40x – infiltrat inflamator limfo-plasmocitar (incidenta maxima in specimen) ;

c – Magnificatie 20x – celule gigante multinucleate de corp strain

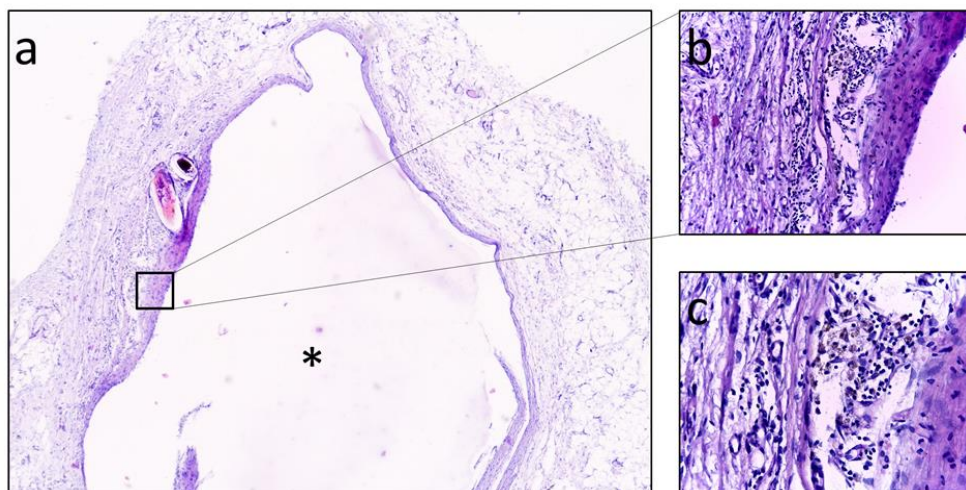


Fig.5.7 *Implant subcutanat cu material de sigilare tip giomer (S)*

* - Spațiul în care s-a aflat materialul implantat

a– Magnificație 4x – imagine de ansamblu – capsula fibroconunctivă constituită în proximitatea implantului ; *b* – Magnificație 20x – infiltrat inflamator limfo-plasmocitar (incidență maximă în specimen) ; *c* – Magnificație 40x – infiltrat inflamator limfo-plasmocitar și structuri vasculare de neogeneză

Cele mai frecvente celule inflamatorii au fost limfocitele și plasmocitele. Nu au fost găsite macrofage ceea ce arată o reacție inflamatorie moderată, cu proliferare capilară minimă, fără edem și capsulă parțial dezvoltată în jurul implantului. Doar câteva celule multinucleare gigantice au fost găsite în jurul implantului subcutanat A1 care prezintă un răspuns inflamator mai exprimat. Giomerul experimental de sigilare S și Beautifil II au fost găsiți moderat iritanti pentru țesutul subcutanat și ușor iritant pentru țesutul muscular în timp ce giomerul experimental de restaurare A1 a fost găsit moderat iritant pentru țesutul subcutanat și muscular. Aceste constatări sunt în concordanță cu rezultatele biocompatibilității obținute pentru Beautifil II de către Tamilselvam S în 2013 [44]

Noile materiale de tip giomer dezvoltate au arătat o scădere a viabilității celulare comparabilă cu cea indusă de Beautifil II și un discret răspuns inflamator la testele de implantare care demonstrează o bună biocompatibilitate a acestor materiale experimentale.

Capitol 6. Concluzii generale

1. Giomerii de restaurare experimentali preparați conțin umplutură originală înglobată în proporții variabile în matrice de rășini preparată din monomeri comerciali Bis-GMAcom (G1,G2,G3) sau în matrice de rășină originală ce conține un derivat experimental analog uretan-tetrametacrilat al Bis-GMA (Bis-GMAexp)(G4,G5)
2. Sticle prereaționate originale PRG1 și PRG2 s-au preparat prin tratarea unei sticle superficial active cu acid polialchenoic P(AA-co-IA-co-Leu) sau cu acid polialchenoic modificat cu grupări polimerizabile (metacrilice) P(AA-co-IA-co-LeuM)
3. A fost preparată deasemenea fluorhidroxiapatita ce intra în compoziția umpluturilor după metoda descrisă în literatură, utilizând hidroxiapatita obținută netratată termic și CaF₂.
4. Patru specimene de giomeri de sigilare cu proprietăți îmbunătățite au fost preparați folosind umplutură originală introdusă în matricea cu monomeri comerciali (S11, S12) sau în matricea cu monomerul original, Bis-GMAexp (S21, S22)
5. În cazul tuturor giomerilor experimentali de restaurare în imaginile SEM se poate observa structura relativ uniformă, în care particulele de umplutură sunt fixate în matricea de polimer. În cazul giomerilor G1 și G3 pe bază de Bis-GMA comercial, se pot distinge particulele de umplutură, de forme neregulate în structura acestora pe când giomerii G4 și G5 se caracterizează printr-o compatibilitate superioară a umpluturii hibride cu matricea organică, particulele de umplutură apărând acoperite (învăluite) total de matricea organică.
6. Ca și în cazul giomerului de restaurare, structura giomerilor experimentali de sigilare investigată la SEM constă dintr-o cantitate de particule bine fixate în matricea polimerică. Comparativ cu giomerul de restaurare, se observă o mai mare pondere a matricii polimerice care înglobează și fixează particulele de umplutură, prezente de data aceasta într-o cantitate mai mică în material.
7. Pentru giomerii experimentali de restaurare G4 și G5 conversia monomerilor este 78,9% și respectiv 72,12%, față de 45,27%, 54,26% și 49% înregistrată pentru G1, G2 și respectiv G3. În concluzie, giomerii experimentali cu matrice polimerică pe bază de Bis-

GMAexp prezintă conversii mult îmbunătățite față de giomerii experimentali pe bază de Bis-GMA comercial.

8. Valorile absorbției de apă pentru giomerii G1, G2, G3 sunt mult mai mici decât valorile pentru giomerii G4 și G5. Absorbția apei este influențată în primul rând de natura matricei polimerice din giomeri și mult mai puțin de natura umpluturii hibride; valorile mari înregistrate în cazul giomerilor G4 și G5 se datorează matricii polimerice uretanice hidrofile din componența lor.
9. Solubilitatea în apă pentru giomerii derivând de la Bis-GMA comercial a înregistrat valori negative: $-5,09 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ în cazul G1, $-2,83 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ în cazul G2, și respectiv $-2,26 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ în cazul G3. În cazul giomerilor G4 și G5 solubilitatea a înregistrat valori pozitive, ajungând la $10, 12 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ în cazul G5.
10. Valorile modificărilor de culoare ale giomerilor experimentali expuși la substanțe colorante obținute prin două metode (utilizând spectrele de reflexie și respectiv prelucrarea imaginilor digitale cu ajutorul unei aplicații software, DISCOLOR) pot fi bine corelate; diferențele nedepășind 2.0 unități CIELAB (limita de acceptabilitate fiind de 3,3 unități CIELAB).
11. Giomerii experimentali de restaurare care s-au colorat cel mai puțin după expunere la substanțe colorate au fost G4 și G5, giomeri pe bază de matrici polimerice uretanice.
12. La testarea proprietăților mecanice pentru giomerul G5 s-a înregistrat o rezistență la încovoiere de 89.91 MPa, mult mai mare decât pentru celelalte materiale experimentale. Obținerea acestei valori pentru rezistența la încovoiere se datorează prezenței în compoziția acestui giomer a monomerului Bis-GMAexp. Față de Bis-GMAcom care are doar două grupări metacrilat, monomerul Bis-GMAexp prezintă patru grupări metacrilat polimerizabile. Prin urmare, monomerul Bis-GMAexp este capabil să realizeze o reticulare mai mare în matricea polimerică, conducând la o creștere a proprietăților mecanice față de cazul folosirii de Bis-GMA comercial.
13. Deasemenea giomerii G1, G3 și G5 au prezentat valori ale modulului Young mai mari în comparație cu materialul comercial Beautifil (Shofu), dovedind astfel posibilitatea folosirii clinice a materialelor experimentale de tip giomer din punct de vedere al proprietăților mecanice

14. Valorile cantității eliberate de ioni fluorură de către giomerii de restaurare experimentali în ziua 60 sunt comparabile cu cele ale cantităților de ioni fluorură eliberate din cimenturile glassionomere. Cantitatea de ioni fluorură eliberată /zi a devenit similară pentru giomerii experimentali în ziua 60, variind de la 1,5 ppm la 1,64 ppm, în timp ce pentru Beautifil II a ajuns la jumătate din concentrația eliberată de giomerii experimentali (0,83 ppm).
15. Cantitatea de ioni fluorură eliberată pentru toți giomerii de sigilare experimentali depășește cantitatea de ioni fluorură eliberată de produsul comercial pentru aceeași perioadă de timp, după 50 zile de stocare în apă distilată, acesta fiind aproximativ de două ori mai mare în cazul giomerilor S11 și S12, și de trei ori mai mare în cazul giomerilor S21 și S22 comparativ cu cea obținută pentru produsul comercial Beautifil II.
16. Giomerii prezintă radioopacitate mai mare decât 2mm Al, fiind peste limita minimă impusă de standardul internațional ISO 4049/2000 (1mm Al). Smălțul dentar are o radioopacitate de 2 mm Al, iar dentina, o radioopacitate de 1 mm Al.
17. Dintre cele două sisteme adezive inovatoare (A1 și A2) dezvoltate pentru restaurările dentare în scopul reparării leziunilor carioase din smalț sau dentină folosind protocoale clinice adecvate, sistemul adeziv A2 care conține acid polialchenoic modificat PAlk-2-MA a condus la o sigilare îmbunătățită la interfața cu dentina și la o adeziune perfectă la interfața cu smalțul în restaurările dentare cu giomer.
18. Constatările noastre sugerează că microinfiltrarea în restaurările cu giomeri poate fi redusă prin utilizarea unui adeziv în doi timpi pe bază de ionomeri de sticlă modificați cu rășină, care conține un acid polialchenoic cu greutate moleculară relativ ridicată având o formulă chimică specifică care include resturi de L-leucină și grupări metacrilice fotopolimerizabile.
19. Noua metodă de investigarea nondistructivă interfeței de adeziune prin termografia de detecție sincronă caracterizează interfața, fiind capabilă să detecteze fisuri sau goluri prezente pe toată lungimea interfeței, atât marginal cât și în profunzime. Deasemenea această metodă datorită caracterului noninvaziv este indicată pentru investigații in vivo ale interfeței de adeziune.
20. Două materiale de sigilare selectate S12, S22 au fost deasemenea investigate din punct de vedere al adeziunii lor la smalț și rezultatele obținute au fost similare cu cele ale

produsului comercial Fissurit F. Rezultatul ideal s-a obținut cu giomerul de sigilare S12 care a realizat o sigilare perfectă la smalț cu o bună adaptare la anatomia fisurilor ocluzale

21. Rezultatele obținute la testarea citotoxicității materialelor experimentale au arătat o scădere a viabilității celulare produsă de către toate biomaterialele testate (atât experimentale cât și comerciale) în comparație cu martorii; efectul fiind dependent de concentrația lor și de timp.
22. Biomaterialele experimentale au prezentat rezultate similare și / sau mai bune în comparație cu cele comerciale, la testarea biocompatibilității *in vivo*.

Capitol 7. Bibliografie

- [1] R.L. Bowen, "Development of a silica-resin direct filling material", National Bureau of Standards, Report 6333 ,1958.
- [2] R.L. Bowen, "Dental filling material comprising vinyl silane-treated fused silicate and a binder consisting of the reaction product of bisphenol and glycidil acrylate", U.S. Pat., 3.066.112, 1962.
- [3] W. He, R. Benson, "Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics- Properties, Processing, and Applications", Chapter 5: Polymeric Biomaterials, Plastics Design Library, Edited Sina Ebnesajjad, 87-108, 2013.
- [4] N. Mozner, U. Salz "New developments of polymeric dental composites", Progress in Polymer Science, **26**(4), 535-576, 2001.
- [5] B. Van Meerbeek, S. Vargas, S. Inoue, Y. Yoshida, M. Peumans, P. Lambrechts, G. Vanherle, „Adhesives and cements to promote preservation dentistry", Operative Dentistry, **26**, 119-144, 2001.
- [6] B. Van Meerbeek, J. De Munck, Y. Yoshida, S. Inoue, M. Vargas, P. Vijay, K. Van Landuyt, P. Lambrechts, G. Vanherle, "Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges", Operative Dentistry, **28**(3), 215-135, 2003.
- [7] F.R. Tay, E. L. Pashley, C.Huang, M. Hashimoto, H. Sano, R.J. Smales, D.H. Pashley, "The glass-ionomer phase in resin-based restorative materials", Journal of Dental Research, **80**(9), 1808–1812, 2001.
- [8] A. U. J. Yap, S. Y. Tham, L. Y. Zhu, H. K. Lee, "Short-term fluoride release from various aesthetic restorative materials" , Operative Dentistry, **27**(3), 259–265, 2002.
- [9] V. Arora, P. Bogra, „Giomer, a new hybrid aesthetic restorative material," Journal of Conservative Dentistry, **5**(4), 149–155, 2002.
- [10] J. D. Griffin, "Unique characteristics of the giomer restorative system", Inside Dentistry, **10**(3), 1-2, 2014.
- [11] M.A.G. Gonzalez, N.H.A. Kasim, R.D. Aziz, "Microleakage Testing", Annals of Dentistry University of Malaya, **4**(1), 31-37, 1997.
- [12] International Organization for Standardisation (ISO). Dental materials—testing of adhesion to tooth structure, ISO/TS 11405:2003 (E)
- [13] M.A. Saghiri, K. Asgar, M. Lotfi, A.M. Saghiri, P. Neelakantan, J.L. Gutmann, A. Sheibaninia, "Back-scattered and secondary electron images of scanning electron microscopy in dentistry: a new method for surface analysis" Acta Odontol Scand, **70**(6), 603-609, 2012.
- [14] S.F.C. Souza, C. Francci, A.C. Bombana, S. Kenshima, L.C. Barroso, L.C. D’Agostino, A. D. Loguercio, "Qualitative SEM/EDS analysis of microleakage and apical gap formation of adhesive root-filling materials", Journal of Applied Oral Science, **20**(3), 329-34, 2012.
- [15] J.D.B. Featherstone, D. Fried, "Fundamental interactions of lasers with dental hard tissue", Medical Laser Application, **16**(3), 181-194, (2001).
- [16] S. Aksakalli, A. Demir, M. Selek, S. Tasdemir, "Temperature increase during orthodontic bonding with different curing units using an infrared camera", Acta Odontologica Scandinavica **72**(1), 36-41, 2014.
- [17] M. Gomes, A. Devito-Moraes, C. Francci, R. Moraes, T. Pereira, N. Froes-Salgado, L. Yamazaki, L. Silva, D. Zezell, "Temperature Increase at the Light Guide Tip of 15 Contemporary LED Units and Thermal Variation at the Pulpal Floor of Cavities: An Infrared Thermographic Analysis", Operative Dentistry, **38**(3), 324-333, 2013.

- [18] G. Ja-Uk, C. Nak-Sam, “NDE of the Internal hole defect of Dental composite restoration using infrared lock-in thermography”, *Journal of the Korean Society for Nondestructive Testing*, **33**(1), 40-45, 2013.
- [19] G. Ja-Uk, C. Nak-Sam, “Evaluation of Delamination of Dental Composite Restoration using Infrared Lock-in Thermography”, *Composite Research*, **25**(6), 236-240, 2012.
- [20] M. Streza, D. Dadarlat, Y. Fedala, S. Longuemart, “Depth estimation of surface cracks on metallic components by means of lock-in thermography”, *Review of Scientific Instruments*, **84**(7), 074902, 2013.
- [21] S. Sauro, R. Osorio, T.F. Watson, M. Toledano, “Assessment of the quality of resin–dentin bonded interfaces: An AFM nano-indentation, TBS and confocal ultramorphology study”, *Dental Materials*, **28**(6), 622 – 631, 2012
- [22] A.P.N. Carvalho, D.T. Dias, V.C. Bedeschi, O. Nakamura, M.Q. Oliveira, “In vitro thermal diffusivity measurements as aging process study in human tooth hard tissues”, *Journal of Applied Physics*, **114**(19), 194705, 2013.
- [23] B.M. Owens, W.W. Johnson, E.F. Harris, “Marginal permeability of self-etch and total etch adhesive systems”, *Operative Dentistry*, **31**(1), 60-67, 2006.
- [24] C.E. Dorfer, H.J. Stachle, M.W. Wurst, H. Duschner, T. Pioch, “The nanoleakage phenomenon: influence of different dentin bonding agents, thermocycling and etching time”, *European Journal Of Oral Sciences*, **108**(4), 346-351, 2000.
- [25] C. Prati, L. Tao, M Simpson, D.H. Pashley, “Permeability and microleakage of Class II resin composite restorations”, *Journal of Dentistry*, **22**(1), 49-56, 1994.
- [26] K Derhami, P Coli, M. Brannstrom, “Microleakage in class 2 composite resin restorations”, *Operative Dentistry*, **20**(3), 100-105, 1995.
- [27] C. Beznos, “Microleakage at the cervical margin of composite class II cavities with different restorative techniques” *Operative Dentistry*, **26**(1), 60-69, 2001.
- [28] A.R. Yazici, C. Celik, G. Ozgunaltay, “Microleakage of different resin composite types”, *Quintessence International*, **35**(10), 790-794, 2004.
- [29] M.J. Tyas, M.F. Burrow, “Adhesive restorative materials: A review”, *Australian Dental Journal*, **49**(3), 112-121, 2004.
- [30] Y. Yoshida, S. Inoue, “Chemical analyses in dental adhesive technology”, *Japanese Dental Science Review*, **48**(2), 141—152, 2012.
- [31] B. Van Meerbeek, “On the development of the new bonding agents. *Espertise magazine*”, **21**, 20-21, 2012.
- [32] K. Ikemura, F.R. Tay, T. Endo, D.H. Pashley, “A review of chemical-approach and ultramorphological studies on the development of fluoride-releasing dental adhesives comprising new pre-reacted glass ionomer (PRG) fillers”, *Dental Materials Journal*, **27**(3), 315-339, 2008.
- [33] K.L. Van Landuit, J. Snauwaert, J. De Munk, M. Peumans, Y. Yoshida, A. Poitevin, E. Coutinho, S. Kazuomi, P Lambrechts, B. Van Meerbeek, “Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives”, *Biomaterials*, **28**(26), 3757-3785, 2007.
- [34] A.C. Pedreira De Freitas, L.C. Espejo, S.B. Botta, F. Sa Teixeira, M.A. Cerqueira Luz, N. Garone-Netto, A.B. Matos, M.C. Barbosa Da Silveira Salvadori, “AFM analysis of bleaching effects on dental enamel microtopography”, *Applied Surface Science*, **256**(9), 2915–2919, 2010.
- [34] M.B. Lopes, M.A. Sinhoreti, A. JR. Gonini, S. Cosani, J.F. Mc Cabe, “Comparative study of tubular diameter and quantity for human and bovine dentin at different depths”, *Brazilian Dental Journal*, **20**(4), 279-283, 2009.

- [35] S. Habelitz, M. Balooch, S.J. Marshall, G. Balooch, G.W. Marshall, “In situ atomic force microscopy of partially demineralised human dentin collagen fibrils”, *Journal of Structural Biology*, **138**(3), 227–236, 2002.
- [36] M.R. Carrilho, F.R. Tay, J. Sword, A.M. Donnelly, K.A. Agee, Y. Nishitani, F.T. Sadek, R.M. Carvalho, D.H. Pashley, “Dentine sealing provided by smear layer/smear plugs vs. adhesive resins/resin tags”, *European Journal of Oral Sciences*, **115**(4), 321–329, 2007.
- [37] C. Prejmerean, D. Prodan, M. Vlassa, M. Sreza, T. Buruiana, L. Colceriu, V. Prejmerean, S. Cuc, M. Moldovan, “ATR technique an appropriate method for determining the degree of conversion in dental comomers”, *Measurement Science and Technology*, **27**(12), 124008, 2016.
- [38] M. Streza, I. Hodisan, C. Prejmerean, C. Boue, G. Tessier, “Lock-in thermography, penetrant inspection, and scanning electron microscopy for quantitative evaluation of open micro-cracks at the tooth-restoration interface”, *Journal of Physics D: Applied Physics*, **48**(10), 105401, 2015.
- [39] J. Leirskar, K. Helgeland, “Mechanism of toxicity of dental materials”, *International Endodontic Journal*, **14**, 42-48, 1981.
- [40] International Organization for Standardisation (ISO). Biological evaluation of medical devices. ISO 10993-6:2007
- [41] E. Bodrumlu, M. Muglali, M. Sumer, T. Guvenc, “The response of subcutaneous connective tissue to a new endodontic filling material”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **84**(2), 463-467, 2008.
- [42] B. Swetha, S. Mathew, B.V. Sreenivasa, N. Shruthi, S.H. Bhandi, “Determination of biocompatibility: A review”, *International Dental & Medical Journal of Advanced Research*, **1**, 1-6, 2015.
- [43] M.S. Botsali, A. Kusgoz, S.H. Altintas, H. E. Ülker, M. Tanriver, S. Kiliç, F. Başak, M. Ülker, “Residual HEMA and TEGDMA release and cytotoxicity evaluation of resin-modified glass ionomer cement and compomers cured with different light sources”, *Scientific World Journal*, ID 218295, 2014
- [44] S. Tamilselvam, M.J. Divyanand, P. Neelakantan, “Biocompatibility of a Conventional Glass Ionomer, Ceramic Reinforced Glass Ionomer, Giomer and Resin Composite to Fibroblasts: in vitro Study”, *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, **37**(4), 403-406, 2013.