

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MATERIAIS DENTÁRIOS  
DOUTORADO EM MATERIAIS DENTÁRIOS

LIGIA MARIA NOGARETT PIBERNAT DE CARVALHO

Avaliação da liberação de bisfenol A em blocos de materiais dentários para CAD/CAM

Porto Alegre  
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MATERIAIS DENTÁRIOS  
DOUTORADO EM MATERIAIS DENTÁRIOS

LIGIA MARIA NOGARETT PIBERNAT DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE BISFENOL A EM BLOCOS DE MATERIAIS  
DENTÁRIOS PARA CAD/CAM**

Porto Alegre

2017

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MATERIAIS DENTÁRIOS  
DOUTORADO EM MATERIAIS DENTÁRIOS

LÍGIA MARIA NOGARETT PIBERNAT DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE BISFENOL A EM BLOCOS DE MATERIAIS  
DENTÁRIOS PARA CAD/CAM**

Porto Alegre

2017

LÍGIA MARIA NOGARETT PIBERNAT DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE BISFENOL A EM BLOCOS DE MATERIAIS  
DENTÁRIOS PARA CAD/CAM**

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, pela Faculdade de Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Área de concentração: Materiais Dentários.

Linha de pesquisa: Materiais Odontológicos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Gonçalves Mota

Porto Alegre

2017

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C331a Carvalho, Ligia Maria Nogarett Pibernat de  
Avaliação da liberação de Bisfenol A em blocos de materiais  
dentários para CAD/CAM / Ligia Maria Nogarett Pibernat de  
Carvalho. – Porto Alegre, 2017.  
42 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia,  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS.  
Área de Concentração: Materiais Dentários.  
Linha de Pesquisa: Materiais Odontológicos.  
Orientação: Prof. Dr. Eduardo Gonçalves Mota.

1. Odontologia. 2. Materiais Dentários. 3. Cromatografia de  
Alta Eficiência. 4. Bisfenol A. 5. CAD/CAM - Computação.  
I. Mota, Eduardo Gonçalves. II. Título.

CDD 617.692

Ficha elaborada pela bibliotecária Cíntia Borges Greff CRB 10/1437

Aos meus pais, João Geraldo e Onélia,  
A minha família: Ana, Gerson,  
Orlando, Neneca, João, Luíza,  
Gustavo, Gabriela, Pietro,  
A minha filha Maria Carolina,  
O amor de vocês me fortalece.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço a deus por me amparar nos momentos difíceis, me dando força interior para superar as dificuldades, para seguir em frente, mostrar os caminhos nas horas incertas e me abençoar sempre.

À minha filha, Maria Carolina por ser a bênção da minha vida, estar sempre ao meu lado com seu apoio e carinho nos momentos mais difíceis. Teu amor e admiração servem de incentivo para minha vida.

Aos meus pais, João Geraldo e Onélia, meu eterno agradecimento, meu amor maior, por tudo que sou e por ser filha de vocês.

Minha gratidão, meu amor e admiração!

A minha família, Ana, Gerson, Orlando, Neneca, João, Luiza, Gustavo, Gabriela e Pietro... Meu amor e gratidão por entenderem meus objetivos e não medirem esforços para que eu consiga alcançá-los. Sem vocês nada disso seria possível.

Amo vocês!

À professora Ana Maria Spohr, pelo conhecimento transmitido ao longo destes anos, por sua amizade e incentivo constante, muito obrigada!

Ao Dr. Carlos Eduardo Leite que não mediu esforços para a realização desta pesquisa, por ensinar com dedicação e paciência, por transmitir conhecimento e por sua amizade , muito obrigada !

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que me proporcionou um ensino de excelência sendo essencial para minha formação profissional.

À coordenadora do programa de pós-graduação em odontologia da PUCRS, professora Ana Maria Spohr.

A Capes, pelo apoio financeiro através da bolsa, indispensável na realização deste curso.

Ao meu orientador, prof. Eduardo Gonçalves Mota, por todos estes anos de ensinamento e amizade.

Aos professores do programa de graduação e pós-graduação, professores: Ari Tietzmann, Ana Maria Spohr, Luiz Henrique Burnett Junior e Maria Marta Campos pelo conhecimento transmitido, pela dedicação, incentivo e ensinamentos, fundamentais para minha formação profissional.

Aos colegas de pós-graduação: Augusto Wingert, Carlos José Petry Filho, Claudia Freitas De Moura Modena, Daniele Morosini Costa, Deborah Stona, Dimas João Rodrigues Neto, Duziene Denardini Pereira, Fernanda Borguetti Manfroi, Heloisa Pressi, Heloisa Costa, Ivana Agnoletto Souza, Juliana Doncatto Bettinelli, Leonardo De Cesero, Lisiane Martins Fracasso, Mariana Roennau Lemos Rinaldi, Patrícia Scheid Jordan, Tamara Paludo, Vania Stephanie Sanchez Gamarra e Maurem Leitão pela troca de conhecimento e por compartilharem comigo a vida acadêmica.

Ao funcionário, Antônio Carlos Teixeira Miranda, por estar sempre presente, sem medir esforços auxiliando no laboratório de materiais dentários, muito obrigada!

As funcionárias da Disciplina de Dentística por todo carinho e pelo convívio durante o estágio na disciplina.

Aos funcionários do Instituto de Toxicologia da PUCRS, Priscila Schmitt Salles e Carlos Eduardo Leite pela dedicação e competência.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS, Davenir, Gabriel, Kléber e Vanessa por estes quatro anos de convívio e solicitações ininterruptas sempre atendidas com presteza e dedicação por vocês,

Muito obrigada!



E a todos os amigos que aqui não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a concretização deste estudo,

Muito obrigada!

Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, de repente, você estará fazendo o impossível. (Francisco De Assis).

## RESUMO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o componente Bisfenol A presente em blocos de materiais dentários utilizados no sistema CAD/CAM quanto a liberação ou não de Bisfenol A. Foram avaliados para a realização deste estudo in vitro, blocos para CAD/CAM, Lava Ultimate, Enamic e Mark II, em fragmentos padronizados, cuja matriz de resina composta continha Bisfenol A. Foram confeccionados 10 fragmentos de cada um dos blocos: n = 30, imerso em água deionizada no grupo 1 e saliva artificial KinHidrat no grupo 2 em frasco protegido da luz. Armazenadas em estufa por 24hs, todas as amostras, após o período de 24hs, foram armazenadas em recipientes de 1,5ml contendo 1,0 ml de saliva artificial (KIN HIDRAT, PharmaKIN, São Paulo, Brasil) no grupo 1 e água deionizada no grupo 2 e após congeladas à -80°C por 24hs. Decorrido o período de 24h, as amostras foram submetidas a cromatografia de alta eficiência (HPLC) no Instituto de Toxicologia e Farmacologia da PUCRS com metodologia descrita no estudo. Após análise cromatográfica dos grupos 1 e 2 observou-se a não liberação de Bisfenol A em nenhum dos grupos de amostras testadas. Todos os grupos e amostras apresentaram pico de liberação de substância não identificada de diferente peso molecular e diferente tempo de quebra do padrão de Bisfenol A. Pesquisas adicionais, empregando outros métodos de análise são necessárias para examinar os efeitos estrogênicos cumulativos do Bisfenol A de materiais dentários para CAD/CAM e resinas compostas.

**Palavras-chaves:** Materiais Dentários. Cromatografia de Alta Eficiência. Bisfenol A. CAD/CAM.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to assess the presence of Bisphenol A in dental material used on CAD/CAM blocks. For this *In Vitro* study, blocks for CAD-CAM, Lava Ultimate, Enamic and Mark II in standardized fragments containing Bisphenol A were evaluated. Ten fragments of each block were made: n = 30, immersed in deionized water on group 1 and artificial saliva Kin Hidrat on group 2 in a light protected bottle. Stored in a culture stove for 24 hours, all samples were put in 1,5ml bottles containing 1,0ml of artificial saliva (KIN HIDRAT, PharmaKIN, São Paulo, Brazil) on group 1 and deionized water on group 2, and then frozen in -80°C for 24 hours. After the 24 hour period, the samples were submitted to High Efficiency Chromatography on Toxicology and Pharmacology Institute of PUCRS as methodology described on this study. After chromatographic analysis of groups 1 and 2, the non-release of Bisphenol A was observed in all groups of samples tested. All groups and samples presented peak release of unidentified substance of different molecular weight and different breaking time than the Bisphenol A standard. Additional researches using other analysis methods are needed to examine the cumulative estrogenic effects of Bisphenol A dental materials for CAD CAM and composite resins.

**Keywords:** Dental Materials. High Efficiency Chromatography. Bisphenol A. CAD/CAM.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bloco de resina CAD CAM.....	22
Figura 2 - Obtenção dos fragmentos dos blocos de CAD/CAM .....	23
Figura 3 - Desenho experimental do estudo.....	24
Figura 4 - Freezer -80°C.....	29
Figura 5 - Multivórtex.....	29
Figura 6 - Centrífuga .....	30
Figura 7 - Bloco de aquecimento e evaporação .....	31
Figura 8 - Frasco com viélinert .....	31
Figura 9 - Cromatografia de Alta Eficiência .....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos materiais que serão utilizados no estudo conforme fabricante.....	25
--	----

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Scaneamento de Ions totais (TIC) e busca por $m/z$ específica 227 (BPC).....	26
Gráfico 2 - Monitoramento específico da $m/z$ 227.1 .....	26
Gráfico 3 - Utilização das energias 10 e 25V para a análise dos fragmentos gerados .....	27
Gráfico 4 - Análise da transição 227.1 para 210.9.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	–	Porcentagem
µm	–	Micrometro
°	–	Grau
°C	–	Grau Celsius
α	–	Nível de significância
3D	–	Tridimensional
CAD	–	Desenho guiado por computador
CAM	–	Fabricação guiada por computador
et al.	–	Abreviatura de et alii (e outros)
min	–	Minutos
mm	–	Milímetro
mm/minuto	–	Milímetro por minuto
n	–	Número de corpos de prova
p	–	Valor de probabilidade
PUCRS	–	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RN	–	Regular Neck
MS	–	Massa
S	–	segundos
Bis GMA	–	Bisfenol A glicil di-metacrilato
Bis EMA	–	Bisfenol A glicil di-metacrilato etoxilado
BIS DMA	–	Bisfenol A – Dimetacrilato
TEG DMA	–	Trietileno Glicil Di-metacrilato
UHPLC	–	High-performanceliquidchromatography
IN Vitro	–	Em vidro / fora dos sistemas vivos
UNICAMP	–	Universidade Estadual de Campinas



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>21</b>
3.1 OBJETIVOS .....	21
3.2 HIPÓTESES .....	21
<b>4 MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
4.2 MATERIAIS .....	24
4.3 CALIBRAGEM DO APARELHO DE CROMATOGRAFIA.....	25
4.4 ENSAIO DE CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) .....	28
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CCE-FOPUCRS PROTOCOLO #6566</b> .....	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A odontologia estética conta com constantes avanços e entra na era tecnológica com a evolução do Sistema CAD/CAM e a infinidade de materiais elaborados para ele. CAD significa Computer Aided Design e CAM significa Computer Aided Manufacturing (DESENHO GUIADO POR COMPUTADOR/FABRICAÇÃO GUIADA POR COMPUTADOR) que a partir da década de 80 foi introduzida no mercado odontológico (LIU, 2005). O objetivo desse método era possibilitar que a fase laboratorial de próteses unitárias pudesse ser executada pelo próprio clínico em seu consultório em sessão única (LIU, 2005). Este advento, revoluciona a odontologia moderna e ainda pode revolucionar a indústria de materiais odontológicos, para tanto é necessário entender suas propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas.

A partir do século XVII, encontramos descritos a utilização de porcelanas na odontologia, Alexis Duchateau, um boticário, cansado das manchas e do mal cheiro da sua “dentadura”, alia seus conhecimentos aos do dentista Nicholas Dubois de Che'mant e juntos conseguiram a fabricação de uma prótese total de porcelana, representando um marco na odontologia que inicia o uso de cerâmicas para confeccionar dentes para próteses totais, proporcionando melhor higiene, estética e menor porosidade em dentes para prótese total (KELLY; BENEDETTI, 2011). As cerâmicas evoluíram e vem sendo modificadas em composição, cor e técnicas ao longo do tempo (HAMZA et al., 2013).

Os primeiros materiais usados para a fabricação dos blocos utilizados no sistema CAD/CAM foram de cerâmica feldspática (LIU, 2005) em 1985 e gradativamente outras cerâmicas, resinas compostas e materiais acrílicos também foram sendo disponibilizados no mercado (FASBINDER, 2010).

Os blocos de cerâmica para CAD/CAM disponíveis para odontologia incluem cerâmica de vidro de silicato de lítio, cerâmica de vidro reforçado com leucita, cerâmica de vidro feldspática, óxido de alumínio e policristais de zircônia tetragonal, resina composta, acrílico (KELLY; BENETTI, 2011) e mais recentemente cerâmica infiltrada por resina bisfenol A.

Primeiro bloco de resina composta para o sistema CAD/CAM foi lançado em 2000. Um composto polimerizável por ativação de luz por processos industriais.

Concomitantemente com o desenvolvimento dos blocos de resina para CAD/CAM a tecnologia de resina composta direta também evoluía, porém a técnica indireta possibilitava a diminuição da micro infiltração, melhora das propriedades mecânicas do material e menor lixiviação de monômeros de dimetacrilatos não-convertidos e radicais livres (LEPRINCE et al, 2013).

A melhora significativa nas propriedades mecânicas dos blocos de resina CAD/ CAM é relatada devido a aplicação de calor sob alta pressão aos compostos resinosos híbridos, nanoparticulados e nano híbridos ainda na fabricação dos blocos que evitaria uma polimerização incompleta. Os autores ainda citam a facilidade de reparo em *onlays*, *inlays* e facetas de blocos resinosos o que não é possível em blocos de cerâmicas (NGUYEN et al., 2012).

Torna-se importante neste momento entender a evolução de materiais odontológicos restauradores desde estudos onde foram utilizados a união da resina epóxi, que apresenta baixa alteração, ao metacrilato de glicidila que proporcionou uma rápida polimerização como a da resina acrílica que era utilizada, e assim foi criada uma resina híbrida proveniente do éster do Bisfenol A, conhecido na odontologia como Bis-GMA (Bisfenoldicetona do éter do glicidildimetacrilato) (BOWEN, 1963). As resinas compostas consistem de matriz resinosa e carga que são, normalmente, partículas de vidro, quartzo ou material cerâmico (FINER, SANTERRE, 2004a).

O Bis-GMA sofreu modificações ao longo do tempo assim como outros componentes da resina composta do tipo epóxi para melhoria das propriedades mecânicas, químicas e estéticas; como o aumento de carga inorgânica que produz efeito nas características mecânicas do material bem como a redução do volume que diminui a contração de polimerização (HIRATA, MAZZETTO, YAO, 2000). Com o desenvolvimento do diluente TEG-DMA, houve melhor grau de conversão, e as matrizes orgânicas como o Bis-GMA permitiram a polimerização de camadas mais espessas por menos tempo (RAIGRODSKI, 2004).

Mesmo com a evolução destes materiais a conversão dos monômeros residuais ainda continua sendo discutida na literatura (HIRATA, MAZZETTO, YAO, 2000; RAIGRODSKI, 2004). Materiais como blocos de cerâmica para utilização em CAD/CAM que contenham resinas compostas do tipo epóxi podem liberar monômeros residuais (TANAKA et al, 1991).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Tanaka et al. (1991) desenvolveu um método de medição da quantidade de monômeros derivado de resina composta por foto polimerização por espectroscopia de massa (MS) e avaliação de monômeros residuais por Cromatografia Gasosa tendo como variável o tempo de irradiação. O aumento do período de irradiação da resina composta variou de 30s a 50s, o que resultou em um decréscimo significativo nos níveis de monômeros residuais (TANAKA et al., 1991).

Hanks et al. (1994) em seu estudo teve como objetivo medir as concentrações dos componentes de resina composta nas proteínas do sangue e com isso determinar a permeabilidade de difusão dos componentes da resina nestas moléculas. O principal relato descrito neste estudo demonstrou que para todas as moléculas testadas, a permeabilidade de difusão era proporcional ao peso molecular de cada molécula, em concentrações suficientes para ocorrer a cito toxicidade para células pulpares e também cita que baixas concentrações podem provocar outras reações biológicas (HANKS et al., 1994).

Finer e Santerre (2004b) relata estudos realizados avaliando a estabilidade mecânica das resinas compostas, porém evidencia que há poucos estudos que consideram a estabilidade química após exposição a fluidos biológicos. Considera importante a investigação do mecanismo molecular de interações entre a esterase e a resina composta. A saliva humana apresenta diferentes níveis de atividade hidrólise que apresenta afinidade com colesterol esterase. Esta atividade pode gerar degradação da resina composta. Assim, há a hipótese de que a estrutura química de uma resina composta afeta diretamente sua bioestabilidade com relação à hidrólise dos grupos monoméricos ésteres. Com esta evidencia, investigou a natureza da degradação de resinas compostas baseadas em BIS-GMA / TEG-DMA (bis) e Bis-GMA modificada por uretano / TEGDMA / BisEMA (Ubis). Com base no cromatograma de dados, observou pouco Bis-GMA remanescente na mistura de monômeros. Os resultados deste estudo são importantes já que estudos demonstraram que os derivados de bisfenol-A, isolados na saliva têm mostrado efeitos estrogênicos in vitro. Enquanto co-monômeros tais como EGDMA e TEGDMA podem promover a proliferação de microorganismos cariogênicos como

*Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus sobrinus*. As diferenças vistas entre bis e Ubis sugerem que materiais respondem de forma diferente as esterases encontradas na saliva humana. Com base nestas descobertas, o autor sugere que fabricantes devem considerar o teste de estabilidade bioquímica como parte de sua avaliação de rotina (FINER; SANTERRE, 2004b).

Sideridou e Achilias (2005) avaliou o efeito da estrutura química do monômero no grau de conversão, na absorção de água, no módulo de elasticidade e características de expansão térmica dos componentes da resina composta. Observou que amostras retiradas para análise, por HPLC, em intervalos diferentes de tempo: 3, 6 e 24 horas (1 dia), 72 h (3 dias), 144 horas (6 dias) e de 720 horas (30 dias) determinaram a diminuição nos valores da quantidade de monômero fracionado, e também o aumento da extensão da polimerização e diminuição de monômero não reagido. A resina de Bis-GMA fotopolimerizada polimerizou completamente em cerca de 3 dias. O conteúdo liberado após 30 dias não foi estatisticamente diferente do que liberado após 3 dias. Já quando polimerizado por mais tempo, a liberação de substâncias foi menor, porém ocorreu até os 30 dias (SIDERIDOU; ACHILIAS, 2005).

Zimmerman-Downs et al. (2010) examinou os efeitos dos materiais utilizados para selamento de fissuras dentais e níveis de Bisfenol A presentes no sangue e saliva. Nos grupos do estudo, foi feita uma amostra de conveniência, de 16 mulheres e 14 homens, nos de 18 a 40 anos de idade, sem histórico de selantes dentários ou colocação de material composto, e sem exposição prévia a Bis-GMA em sua forma bruta. A exposição a diferentes resinas dentárias contribuiu para os níveis de concentração salivar e indicou a exposição e o uso de produto com Bis-GMA (ZIMMERMAN-DOWNS et al., 2010).

Rathee, Malik e Singh (2012) descreve a utilização do Bisfenol A (BPA) na fabricação de produtos comerciais, incluindo resinas dentais, plásticos de policarbonato, bem como o revestimento interno de latas de alimentos. BPA é um precursor para o monômero de resina de Bis-GMA. Durante o processo de Bis-GMA selante, Bisfenol A pode estar presente como uma impureza, ou como um produto de degradação de Bis-GMA por meio de esterases presentes na saliva de fabricação. A lixiviação destes monômeros em resinas compostas podem ocorrer durante o

período de ajuste inicial da restauração e o conjunto com o fluido de sorção e de sorção com o tempo, esta lixiviação química de selante pode ser bio ativa. O autor encontrou efeito estrogênico com a ABP, Bis-DMA, e Bis-GMA porque o Bisfenol A necessita de especificidade estrutural como um agente de ligação natural para o receptor de estrogênio. Existe preocupação em relação à segurança dos materiais resinosos odontológicos. (RATHEE; MALIK; SINGH, 2012)

Relataram que o Bisfenol A e Bis-DMA quando na simulação de proliferação de células de câncer de mama, provocou aumento do número de receptores de progesterona e mostrou ligação competitiva aos receptores de estrogênio. Estes resultados geraram preocupações consideráveis quanto à segurança dos materiais a base de resina epóxi de uso odontológico. Pequenas quantidades de Bisfenol A podem lixiviar a partir do selante imediatamente após a aplicação dos selantes nos dentes. A fonte de Bisfenol A que lixívia de selantes são passíveis de hidrólise de Bis-DMA, um monômero comum utilizado em formulações de resinas dentais. Nenhum Bisfenol A foi detectado em amostras de sangue, o que indica que não há exposição sistêmica detectável ao Bisfenol A de selante dentários (OLEA et al. 1996).

Hoje, sabe-se que esta substância vem sendo associada a injúria pulpar e citotoxicidade (YANG et al., 2011) além de possuir afinidade ao receptor de estrogênio (RAIGRODSKI et al., 2003) que pode predispor disfunções orgânicas causando doenças e provocar consequências fetais (SHARMA,PADDA, CHOUDHARY,2012). A biocompatibilidade, a adesão a estrutura dental e ser quimicamente inerte são requisitos indispensáveis (RIBANI et al., 2004), contudo, o Bis-GMA segue sendo utilizado em produtos odontológicos.

### **3 PROPOSIÇÃO**

#### **3.1 OBJETIVOS**

O estudo avaliou o componente Bisfenol A presente em blocos de materiais dentários utilizados no sistema CAD/CAM quanto a seguinte variável: liberação ou não de Bisfenol A.

#### **3.2 HIPÓTESES**

O estudo foi desenvolvido sob duas hipóteses experimentais:

- a) há liberação de Bisfenol A nos blocos de resina para CAD/CAM;
- b) materiais cerâmicos híbridos são similares aos de resina composta.



## 4 MATERIAIS E METODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização deste estudo *in vitro*, foram utilizados blocos para CAD/CAM (Fig. 1) em fragmentos padronizados (Fig. 2) descritos na tabela (Tab.1), cuja matriz de resina composta continha Bisfenol A. Foram confeccionados 10 fragmentos de cada um dos blocos: n = 30, utilizando Cortes verticais medindo 1cm x 1,5cm, através de uma máquina de corte Labcut 1010 (ExtecCorp., Londres, Inglaterra) e um disco diamantado (Buheler Series 15LC Diamonds, 111190Z001706) com velocidade de 500 rpm sob constante refrigeração com água, para realizar o ensaio de cromatografia e armazenados, cada fragmento, em um frasco de polipropileno de 1,5ml, (Fig. 3) imerso em água deionizada no grupo 1, a fim de ter um meio de cultura livre do possível viés do frasco de armazenagem da saliva artificial KinHidrat, utilizada no grupo 2, e armazenados em estufa a 37°C protegidos da luz por 24hs.

Figura 1 - Bloco de resina CAD CAM



Fonte: Vita (2016)

Figura 2 - Obtenção dos fragmentos dos blocos de CAD/CAM



Fonte: A autora (2016).

Para confecção das amostras de resina composta, descritas na tabela 1, a resina Charisma (HeraeusKulzer, Hanau, Alemanha), na cor A2 foi inserida com uma espátula Thompson no 6 em incremento único. Dez amostras (n=10) foram obtidas nas dimensões de 3mm de diâmetro e 6mm de altura.

A matriz foi posicionada sobre uma tira de poliéster a fim de planificar a resina sob pressão de uma placa de vidro, a amostra foi planificada e a resina composta foi fotopolimerizada por 20 segundos, conforme orientação descrita pelo fabricante da resina composta, sendo utilizado como fonte de luz o aparelho fotopolimerizador RADII (SDI Limited, Austrália) com potência de 1200 mW/cm<sup>2</sup>. As amostras, após a confecção, foram armazenadas em frascos de prolipopileno de 1,5ml, individuais imersos em água deionizada no grupo 1 e saliva artificial no grupo 2 KinHidrat, pelo período de 24 h à 37°C em uma estufa para culturas modelo 002 CB (Fanem Ltda., São Paulo, Brasil) aguardando a conversão de monômeros residuais.

Figura 3 - Desenho experimental do estudo



Fonte: A autora (2016).

## 4.2 MATERIAIS

Os materiais selecionados para este estudo estão descritos na tabela 1, bem como seus respectivos nomes comerciais, indicação, composição e fabricante.

Tabela 1 - Descrição dos materiais que serão utilizados no estudo conforme fabricante

MARCA COMERCIAL	COMPOSIÇÃO	MATRIZ ORGÂNICA	FABRICANTE
LAVA ULTIMATE	80% de partículas nanocerâmicas, incorporadas em matriz orgânica	BisGMA	3M ESPE, St Paul, Minesota, EUA.
ENAMIC	SiO <sub>2</sub> Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> O K <sub>2</sub> O CaO TiO <sub>2</sub>	Bis GMA	VITA, Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha
MARK II	Cerâmica policromática feldspática	Ausente	VITA, Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha

Fonte: A autora (2016).

#### 4.3 CALIBRAGEM DO APARELHO DE CROMATOGRAFIA

O desenvolvimento de novo método para análise ou a adaptação de um método conhecido requer testes do processo de avaliação que registre a eficiência, denominado validação (RIBANI et al., 2004).

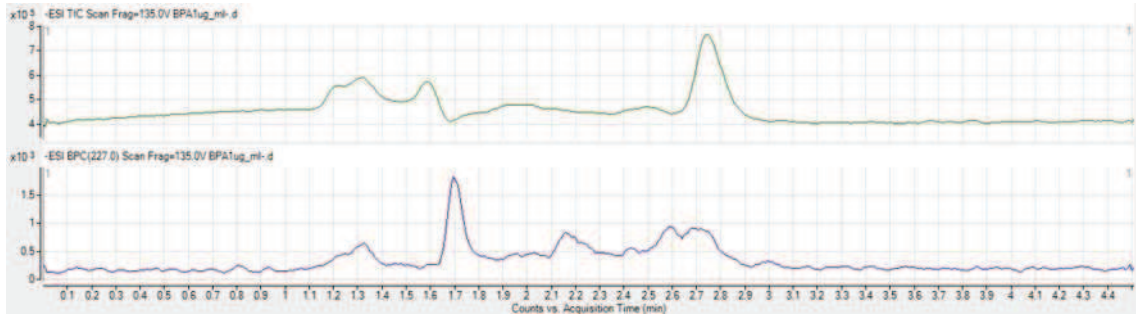
Os parâmetros para análise normalmente são: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; faixa linear; robustez; limite de detecção e limite de quantificação. (RIBANI et al., 2004).

Foram preparadas soluções padrão de Bisfenol A e analisadas conforme técnica descrita por Zimmers et al. (2014) para limite de detecção e limite de quantificação.

A solução padrão de Bisfenol A foi analisada anteriormente por duas outras técnicas as quais não foram sensíveis para detecção de Bisfenol A pelo mesmo método de HPLC.

Nos gráficos gerados e apresentados abaixo observamos a detecção da solução padrão de Bisfenol A por massa específica.

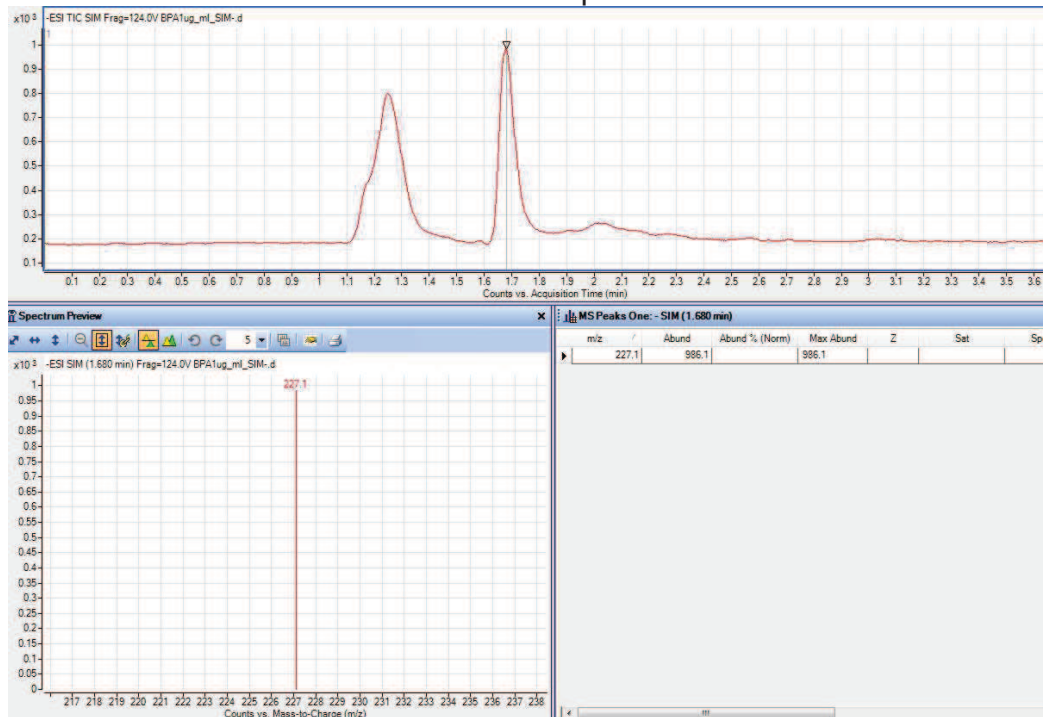
Gráfico 1 - Scaneamento de Ions totais (TIC) e busca por m/z específica 227 (BPC).



Fonte: A autora (2016).

Após a primeira corrida na máquina da solução padrão que serve para limpar a máquina, é feita a calibragem real da solução conforme demonstrado abaixo.

Gráfico 2 - Monitoramento específico da m/z 227.1

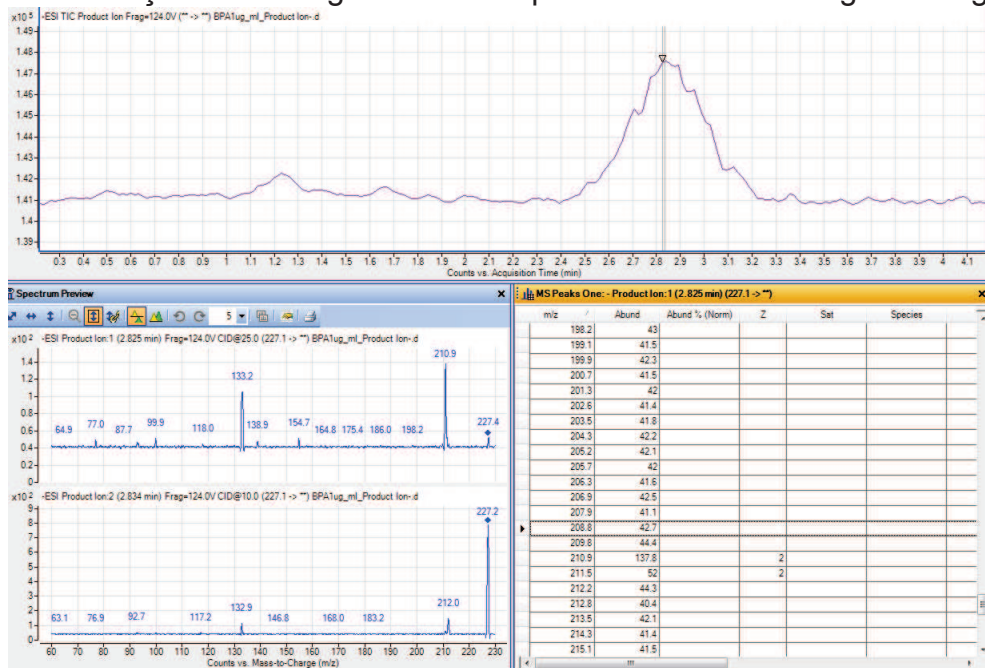


Fonte: A autora (2016).

O preparo da fase móvel foi através da proporção em frasco de vidro de água de Biliquê 50ml e 2µ de metanol sendo solvente A e solvente B Hidróxido de amônia.

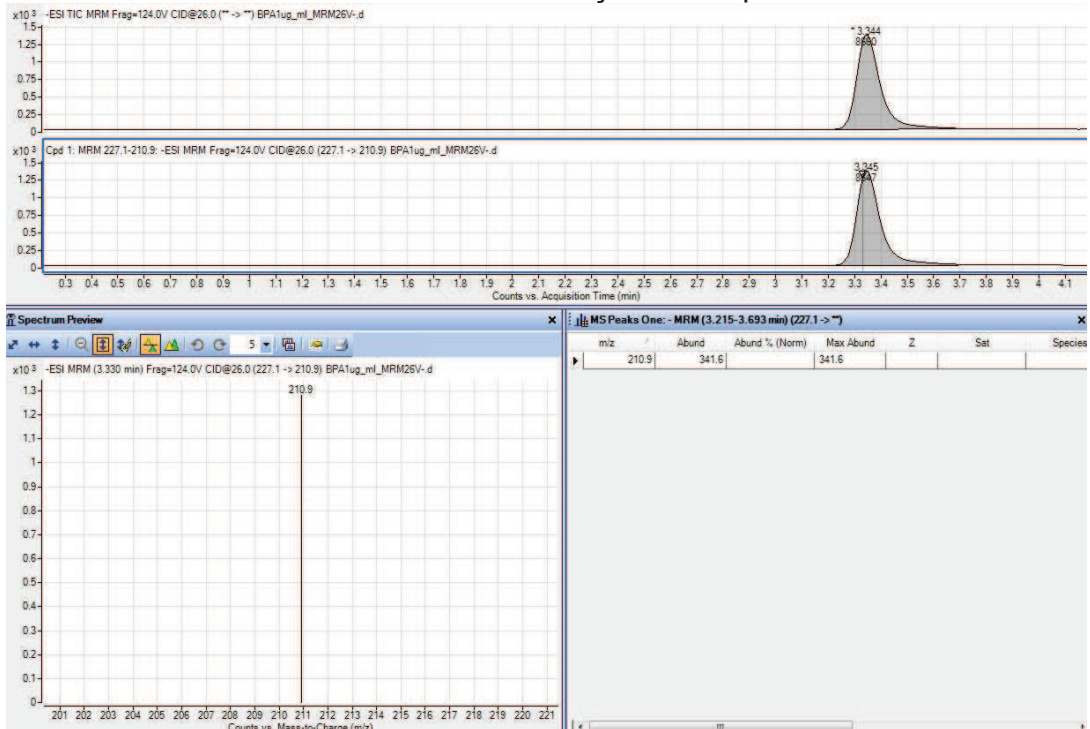
Após a proporção realizada e separada em frasco de vidro, a mesma é levada para o ultrassom para eliminar qualquer excesso de possíveis gases que possam não ter dissolvidos.

Gráfico 3 - Utilização das energias 10 e 25V para a análise dos fragmentos gerados



Fonte: A autora (2016).

Gráfico 4 - Análise da transição 227.1 para 210.9



Fonte: A autora (2016).

#### 4.4 ENSAIO DE CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

De acordo com a metodologia desenvolvida por Zimmers et al. (2014), todas as amostras, após o período de 24hs, foram armazenadas em recipientes de polipropileno de 1,5ml contendo 1,0 ml de saliva artificial (KIN HIDRAT, PharmaKIN, São Paulo, Brasil) no grupo 1 e água deionizada no grupo 2 e após congeladas à -80°C (Fig. 4), na vertical, dentro de caixa de papelão.

Figura 4 - Freezer -80°C



Fonte: A autora (2016).

Decorrido o período de 24h, as amostras foram submetidas a cromatografia de alta eficiência (HPLC) no Instituto de Toxicologia e Farmacologia da PUCRS.

As amostras de todos os grupos com saliva e com água deionizada foram descongeladas em temperatura ambiente (Fig. 6) antes da análise, e logo após, foram inseridas no Vórtex (Glas-Col, Terre Haute, USA) com velocidade de 12.000 rpm, durante 1 minuto. Então adicionado 50µl de ácido clorídrico e 2 ml de éter metil-t- butílico para 500 µL da amostra e agitadas novamente por mais 1 minuto (Fig.5).

Figura 5 - Multivórtex



Fonte: A autora (2016).

A mistura foi centrifugada (Fig. 6) a 3000 rpm durante 5 minutos, e 1 ml do fluante recolhido.



Figura 6 - Centrífuga



Fonte: A autora (2016).

Então colocadas em tubo de ensaio em duplicata (450 $\mu$ l acrescidos de mais 50 $\mu$ l HCL<sup>1</sup> molar). Foi colocado 0,1N de Hidrogênio clorídrico. O solvente orgânico, éter metil-t-butílico foi acrescentad, 2ml para 500 $\mu$ l da amostra.

As amostras foram colocadas novamente no Multivórtex (Glas-col, Terre Haute, USA) e agitadas por 5 minutos com velocidade 70.

A mistura foi centrifugada (CELM, COMBATE, USA) a 3000 rotações por minuto durante 5 minutos, e 1ml flutuante foi recolhido e colocado em frasco de vidro de evaporação.

O solvente foi evaporado em um fluxo de gás a 40 °C (Heating Sterring Module) em bloco de aquecimento e evaporação.

Figura 7 - Bloco de aquecimento e evaporação



Fonte: A autora (2016).

Os resíduos secos foram dissolvidos em 100 $\mu$ l de fase móvel e inseridos novamente em Multivórtex com velocidade de 45 rotações por minuto durante 1 minuto para resuspender a substância de interesse.

A fase móvel foi filtrada com filtro e transferida para um frasco com Viélinert (Millepore, Japan) PvdF 0,22 $\mu$ m com 4mm de diâmetro acoplado dentro de outro frasco viél (Fig. 8).

Figura 8 - Frasco com viélinert



Fonte: A autora (2016).

Foram inseridos 10 µl de cada amostra injetadas na coluna de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Um sistema de espectrometria de cromatografia / espectrometria de massa (1100 sistema de cromatografia líquida de alta eficiência; Agilent, Palo Alto, EUA) e um espectrômetro de massa (Agilent, Palo Alto, EUA) foi usado para determinar os níveis de Bisfenol A.

Figura 9 - Cromatografia de Alta Eficiência



Fonte: A autora (2016).

## 5 RESULTADOS

Após análise cromatográfica dos grupos 1 e 2 observou-se a não liberação de Bisfenol A em nenhum dos grupos de amostras testadas.

Todos os grupos e amostras apresentaram pico de liberação de substância não identificada de diferente peso molecular e diferente tempo de quebra do padrão de Bisfenol A.

Quadro 1 - Verificação de Liberação de substancias

<b>GRUPOS</b>	<b>ÁGUA DEIONIZADA</b>	<b>SALIVA ARTIFICIAL</b>
<b>LAVA ULTIMATE</b>	Não libera	Não libera
<b>ENAMIC</b>	Não libera	Não libera
<b>MARK II</b>	Não contém	Não contém
<b>CHARISMA polimerizada</b>	Não libera	Não libera
<b>CHARISMA não polimerizada</b>	Não libera	Não libera

Fonte: A autora (2016).

## 6 DISCUSSÃO

Uma variedade de métodos analíticos têm sido utilizados para relatar a liberação de Bisfenol A em materiais odontológicos a base de resina composta (Bis-GMA) contudo a metodologia testada para Cromatografia de Alta Eficiência neste estudo não detectou a liberação de Bisfenol A nos blocos de resina para CAD/CAM e na resina composta testada. Este fato, levanta a discussão sobre a replicação da metodologia empregada em estudos anteriores bem como a necessidade de análise direta utilizando meios biológicos com urina, sangue e meios de cultura.

Fox et al. (2011) descrevem a utilização de Bisfenol A na síntese de plásticos de policarbonato e resinas epóxi, amplamente utilizado em produtos de consumo; inclusive como revestimento para o interior de quase todos os recipientes de alimentos e bebidas (caixas térmicas) e papéis de imagem térmica. Não distante da indústria odontológica também utilizado por nós, dentistas.

Importantes implicações para a saúde foram descritas e comprovadas devido a atividade estrogênica. É metabolizado no corpo e excretado na urina. Fox *et al.* apresentou um método preciso, seletivo, sensível e reprodutível de cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de Bisfenol A em urina humana que não é propensa a contaminação exógena o que pode ter sido um fator confundente no presente estudo.

Fator importante, é o potencial de confundir os resultados na análise, uma vez que em materiais odontológicos temos o Bisfenol A ligado a glicidilmetacrilato, de maior peso molecular e diferente energia de quebra da molécula.

Segundo Hope, Reed e Moilanen (2016), resultados negativos e positivos com valores aparentemente elevados de liberação de Bisfenol A gerados nas análises realizadas por eles, foram causados por co-eluição, de um produto químico previamente não identificado, que se presume surgir de um dos iniciadores da polimerização. Estes resultados enfatizam as dificuldades potenciais na obtenção de análises precisas de Bisfenol A em misturas complexas, tais como resinas dentárias e seus extratos e corroboram com os resultados observados neste estudo.

Zimmers et al. (2014), analisaram através da coleta de leite materno de 21 mães que estavam em fase de amamentação nos Estados Unidos por extração em fase sólida e analisada por cromatografia e espectrometria de massa, a qual detectou a presença de Bisfenol A indicando que os seres humanos estão internamente expostos a Bisfenol A estrogénios ativos. Os achados de Zimmers et al. (2014) diferem do resultado encontrado neste estudo, porem deve-se considerar dois fatores: o primeiro a metodologia aplicada para análise direta de meio biológico: o leite materno quando analisado neste estudo somente amostras armazenadas por 24hs e não metabolizadas. O segundo fator é a análise de Bisfenol A enquanto em odontologia encontramos o mesmo ligado a Glicidil Metacrilato. Voltamos aos fatores confundentes de metodologia e resultados.

Zimmermann-Downs et al. (2010) detectaram a presença de Bisfenol A na saliva, porem através do método ELISA, medido por um ensaio de imunoabsorção enzimática. A presença de Bisfenol A foi significativamente elevado o que discorda dos resultados do método empregado neste estudo.

Sideridou e Achilias (2005) avaliaram a eluição de monômeros residuais de resinas odontológicas utilizando cromatografia. O Glicol Dimetacrilato (Bis-GMA), Trietilenoglicoldimetacrilato (TEGDMA), Uretano Dimetacrilato (UDMA), e a mistura destes monômeros. O efeito do tempo de cura na quantidade de monômeros eluídos foi investigado. A concentração dos monômeros extraíveis foi determinada em vários períodos de imersão de 3 h a 30 dias. Os autores observaram que a estrutura química dos monômeros utilizados para a preparação das resinas, afeta diretamente a quantidade de monômeros eluídos, o que sugere que no estudo presente, a relação com a estrutura química dos materiais para CAD/CAM e resina composta, o tempo de exposição do mesmo e falta de meio biológico possa ter interferido na análise.

A exposição ao Bisfenol A está comprovada levando em consideração estudos publicados de análises com materiais biológicos (sangue, leite materno saliva humana) porem não foi observado neste estudo a liberação do mesmo.

Deve ser revisto de forma independente, a metodologia aplicada para tal análise, quando se questiona somente a liberação de Bisfenol A uma vez que este, em materiais dentários, está ligado a Glicidil Metacrilato de maior peso molecular.

## 7 CONCLUSÃO

Não houve liberação de Bisfenol A em blocos de resina para CAD/CAM

Neste estudo, os materiais analisados apresentaram comportamento similar em diferentes meios de armazenagem, não liberando Bisfenol A.

Pesquisas adicionais, empregando outros métodos de análise são necessárias para examinar os efeitos estrogênicos cumulativos do Bisfenol A presente em materiais dentários para certificar ou não sua liberação.

## REFERÊNCIAS

- Bowen RL. Properties of silica-reinforced polymer for dental restorations. *J Am Dent Assoc.* 1963;66:57-64.
- Fasbinder DJ. Materials for chairside CAD/CAM restorations. *Compend Contin Educ Dent.* 2010;31(9):702-9.
- Finer Y, Santerre JP. Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res.* 2004;83(1):22-26.
- Finer Y, Santerre JP. The influence of resin chemistry on a dental composite's biodegradation. *J Biomed Mater Res A.* 2004;69(2):233-46.
- Fox SD, Falk RT, Veenstra TD, Issaq HJ. Quantitation of free and total bisphenol A in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Science.* 2011;34(11):1268-74.
- Hamza TA, Ezzat HA, El-Hossary MMK, Katamish HA, Shokry TE, Rosenstiel SF. Accuracy of ceramic restorations made with CAD/CAM systems. *J Prosthet Dent.* 2013;109(2):83-7.
- Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *J Oral Rehabil.* 1994 Jul;21(4):475-87.
- Hirata R, Mazzetto AH, Yao E. Alternativas clínicas de sistemas de resinas compostas laboratoriais: quando e como usar. *JBC J. Bras. Clin. Estet. Odontol.* 2000;4(19):13-21.
- Hope E, Reed DR, Moilanen LH. Potential confounders of bisphenol-a analysis in dental materials. *Dent Mater.* 2016;32(8):961-7.
- Kelly JR, Benetti P. Ceramic materials in dentistry historical evolution and current practice. *Aust Dent J.* 2011;56(1suppl):84-96.
- Leprince JG, Palin WM, Hadis MA, Devaux J, Leloup G. Progress in dimethacrylate-based dental composite technology and curing efficiency. *Dent Mater.* 2013; 29(2):139-156.
- Liu PR. A panorama of dental CAD/CAM restorative systems. *Compend Contin Educ Dent.* 2005 Jul;26(7):507-8, 510, 512 passim; quiz 517, 527.
- Nguyen JF, Migonney V, Ruse ND, Sadoun M. Resin composite blocks via high-pressure high-temperature polymerization. *Dent Mater.* 2012;28(5):529-34.



Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo Fertrell A et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* 1996;104(3):298-305.

Raigrodski AJ. Clinical and laboratory considerations for the use of CAD/CAM Y-TZP-based restorations. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2003;15(6):469-76.

Raigrodski AJ. Contemporary materials and technologies for all-ceramic fixed partial dentures: a review of the literature. *J Prosthet Dent.* 2004;92(6):557-62.

Rathee M, Malik P, Singh J. Bisphenol A in dental sealants and its estrogen like effect. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16(3):339-42.

Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova* [online]. 2004;27(5):771-780.

Sharma S, Padda BK, Choudhary V. Comparative evaluation of residual monomer content and polymerization shrinkage of a packable composite and on ormorcer. *J Conserv Dent.* 2012;15(2):161-5.

Sideridou ID, Achilias DS. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites Using HPLC. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2005;74(1): 617-26.

Tanaka K, Taira M, Shintani H, Wakasa K, Yamaki M. Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *J Oral Rehabil.* 1991;18(4):353-62.

Yang CS, Wang H, Li XG, Yang Z, Guan F, Jin H. Cancer prevention by tea: Evidence from laboratory studies. *Pharmacol Res.* 2011; 64(2):113-22.

Zimmerman-Downs JM, Shuman D, Stull SC, Ratzlaff RE. Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults. *J Dent Hyg.* 2010;84(3):145-50. Epub 2010 Jul 5.

Zimmers SM, Browne EP, O'Keefe PW, Anderton DL, Kramer L, Reckhow DA et al. Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method. *Chemosphere.* 2014;104:237-43.

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CCE-FOPUCRS PROTOCOLO #6566**