

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PATRÍCIA ALVES SCHEID

**INCORPORAÇÃO DE ÓXIDO DE ZINCO OU EXTRATO DE PRÓPOLIS EM UM CIMENTO
DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO POR RESINA – EFEITO NAS PROPRIEDADES
MECÂNICAS E CITOTOXICIDADE**

Porto Alegre

2014

PATRÍCIA ALVES SCHEID

INCORPORAÇÃO DE ÓXIDO DE ZINCO OU EXTRATO DE PRÓPOLIS EM UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO POR RESINA – EFEITO NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E CITOTOXICIDADE

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima

Porto Alegre

2014

Fontes de Catalogação (CIP)

S318i Scheid, Patrícia Alves

Incorporação de óxido de zinco ou extrato de própolis em um cimento de ionômero de vidro modificado por resina : efeito nas propriedades mecânicas e citotoxicidade / Patrícia Alves Scheid. – Porto Alegre, 2014.
70 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia PUCRS.

Orientador: Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima.

1. Odontologia. 2. Cimento de Ionômero de Vidro.
3. Materiais Dentários. 4. Própolis. 4. Óxido de Zinco.
I. Oshima, Hugo Mitsuo Silva. II. Título.

CDD 617.695

Bibliotecário Responsável

Ginamara de Oliveira Lima

CRB 10/1204

PATRÍCIA ALVES SCHEID

INCORPORAÇÃO DE ÓXIDO DE ZINCO OU EXTRATO DE PRÓPOLIS EM UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO POR RESINA – EFEITO NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E CITOTOXICIDADE

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima – PUCRS

Prof. Dr. Eduardo Gonçalves Mota - PUCRS

Prof. Dra. Maria Martha Campos - PUCRS

Prof. Dr. José Renato Prietsch – UFRGS

Prof. Dr. Bruno Carlini Júnior - UPF

Porto Alegre

2014

Dedico esta tese aos meus pais por acreditarem nos meus sonhos. Por estarem ao meu lado nos momentos ruins. Por comemorarem comigo as vitórias. Pela simples presença de vocês no dia a dia, que me traz segurança e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu namorado Vitor, por estar ao meu lado sempre! Pelo apoio e por entender os momentos de ausência. Por me trazer um mundo leve e cheio de amor. Por me ensinar a ser uma pessoa melhor nos pequenos detalhes.

À minha irmã, Liliane e sua família, Guilherme, Olavo e Alice que trazem um colorido especial à minha vida. Mesmo não tão próximos no dia a dia, mas sempre na torcida pelas minhas conquistas.

Ao meu orientador, prof. Dr. Hugo Oshima pela amizade, transmissão de conhecimento, pela paciência e, principalmente, por toda a confiança demonstrada durante esses 5 anos.

À Universidade Feevale, na pessoa das professoras Dra. Vanusca e Dra. Ana Luiza, pela disponibilização do Laboratório de Citotoxicidade.

À prof. Dra. Ana Luiza e a Marina pelo auxílio nos experimentos de citotoxicidade. Por serem incansáveis, disponíveis e pessoas tão dedicadas!

Ao departamento de Microbiologia da PUCRS, nas pessoas da prof. Dra. Silvia e Laryssa pelos experimentos de microbiologia. Pela dedicação, paciência e por dividirem os conhecimentos comigo.

À minha amiga Luciana pela ideia inicial e por todo o apoio de sempre.

Aos professores Dr. Eduardo Mota e Dra. Luciana Hirakata por serem sempre solícitos, sendo excelentes professores ao dividirem seu vasto conhecimento comigo.

Aos meus amigos de doutorado Catarina, Caio, Juliana e Édio pela parceria, amizade e apoio de sempre.

Aos meus colegas de pós Lúgia, Lisiane, Mariele, Cláudia e Tamara pelo convívio e troca de conhecimentos.

A todos os funcionários da FO-PUCRS pela gentileza e disponibilidade em todos os momentos. Um agradecimento especial à dona Neuza que muito me ajudou estando no laboratório nos momentos que precisei, sempre com muita disposição, atenção e carinho.

Às minhas colegas de trabalho Camila Litz e Eliane Meneghini que me deram o suporte necessário para minha ausência no trabalho durante a realização dos experimentos. E claro, pelo incentivo e amizade constante!

E a toda a minha família e a todos os meus amigos, que de alguma forma entenderam minha ausência e me apoiaram de forma incondicional.

“Uma das melhores coisas na vida são as maravilhosas surpresas que nos reserva.”
(MARLO THOMAS)

RESUMO

O cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) tem como função principal servir como liner ou base na presença de material restaurador ou até mesmo como material restaurador. Em cavidades profundas com ausência de sinais e sintomas de pulpíte irreversível, a dentina afetada por cárie pode ser mantida a fim de evitar a exposição pulpar, permanecendo, assim, um material muito próximo à polpa. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de óxido de zinco ou de extrato de própolis em um CIVMR nas propriedades mecânicas e citotoxicidade. Para o grupo controle, o cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer, 3M ESPE) foi manipulado em sua formulação original (G7). As modificações foram realizadas através da inclusão de óxido de zinco ao pó do CIVMR nas seguintes proporções: 10% (G1), 20% (G2) e 30% (G3) com relação ao peso, sendo aglutinado com o líquido original do material. O extrato de própolis foi inserido ao líquido do Vitremer nas seguintes proporções: 10% (G4), 20% (G5) e 30% (G6) com relação em volume, sendo aglutinado com o pó original do CIVMR. Para a análise das propriedades mecânicas foram realizados os testes de resistência à tração diametral, resistência à compressão, microdureza e rugosidade superficial, 24 horas após a confecção dos corpos de prova. Para a análise da citotoxicidade foram realizados os testes de MTT e vermelho neutro, sendo avaliados nos períodos de 24 e 48 horas. Os dados obtidos foram analisados através do software IBM SPSS 22. A distribuição de normalidade foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade através do teste de Levene. Os testes de rugosidade, microdureza e compressão foram submetidos a ANOVA de um fator e Tukey. O teste de tração diametral foi submetido aos testes de ANOVA ucelentem fator e de Games-Howell. Os testes de citotoxicidade foram submetidos aos testes de ANOVA de um fator e Duncan. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%, considerando $p < 0,05$. Não foi registrada diferença estatística entre os grupos testados nos testes de resistência a compressão e tração diametral com relação ao grupo controle (G7). Na microdureza, os grupos 2, 4 e 6 não diferiram estatisticamente do grupo 7. Com relação à rugosidade, apenas o grupo 6 apresentou média superior ao G7. Nos testes de MTT e vermelho neutro, todos os grupos mostraram valores similares ou superiores ao grupo 7. A adição de

extrato de própolis ou óxido de zinco não interfere nas propriedades mecânicas e na citotoxicidade do CIVMR nas concentrações de até 20%.

Palavras-chave: Cimento de ionômero de vidro. Óxido de Zinco. Própolis.

ABSTRACT

Resin-modified glass-ionomer cement (RMGIC) is mainly indicated as a liner or base in restorative materials. In deep dentinal cavities where there is not symptomatology, only partial dentine is removed in order to avoid the pulp exposure. Thus, the restorative material is very close to the pulp. The aim of this study was to evaluate the incorporation of zinc oxide or extract of propolis in a RMGIC, subsequently testing the mechanical properties and cytotoxicity. For the control group, the RMGIC (Vitremer, 3M ESPE) was handled in its original formulation (G7). Zinc oxide was inserted to the powder of RMGIC in the following proportions: 10% (G1), 20% (G2) e 30% (G3), which were mixed with the original liquid of Vitremer. The extract of propolis was inserted to the liquid of Vitremer in the following proportions: 10% (G4), 20% (G5), 30% (G6), which were mixed with the original powder of Vitremer. Compressive strength, diametral tensile, microhardness and roughness were measured. The cytotoxicity was evaluated by MTT assay and neutral red after 24 and 48 hours of exposition. Data were analyzed using the IBM SPSS 22. To verify normality and homogeneity, Shapiro-Wilk and Levene tests were used, respectively, with significance level of 5%. The roughness, microhardness and compressive strength were assessed by one-way ANOVA followed by a multiple-comparison Tukey post hoc test. The diametral tensile was assessed by one-way ANOVA followed by a multiple-comparison Games-Howell post hoc test. For cytotoxicity tests, one-way ANOVA and Duncan post hoc test was used to identify intergroup differences. The level of significance was set at $p < 0,05$. No significant difference was observed in the compressive strength and diametral tensile among groups in relation to control group (G7). Groups 2, 4 e 6 did not differ in microhardness to the control group (G7). In the roughness test, the group 6 presented the highest mean statistical difference from group 7. Experimental groups showed similar or highest values of cell viability when compared to the group 7 in MTT assay and neutral red tests. The addition of 10% and 20% of extract of propolis or zinc oxide do not interfere in the mechanical proprieties and cytotoxicity of RMGIC.

Keywords: Glass-ionomer cements. Zinc oxide. Propolis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Materiais utilizados no estudo com seus respectivos fabricantes e origem	25
Quadro 2– Composição do cimento de ionômero de vidro modificado por resina que foi utilizado nesse estudo	27
Quadro 3 – Grupos e suas respectivas composições com relação a adição de óxido de zinco incorporado ao pó ou extrato de própolis ao líquido do cimento de ionômero de vidro modificado por resina	28
Quadro 4 – Ensaios, <i>n</i> e dimensões dos corpos de prova	29
Figura 1 – Diferentes proporções de óxido de zinco no frasco original do pó (A) e do extrato de própolis no frasco original do líquido (B).	32
Figura 2 – Teste de rugosidade: rugosímetro (A) e vista aproximada da ponta executando o teste (B).	32
Figura 3 – Teste de microdureza Vickers: ponta de diamante executando a penetração (A) e mensuração das medidas em computador (B).	32
Figura 4 – Teste de tração diametral (A) e teste de compressão (B).	32
Quadro 5 – Solução de DMEM completo	36
Quadro 6 – CMF concentrado	36
Figura 5 – Imagem em microscópio das células em subconfluência (A). Câmara de Neubauer, utilizada para contagem de células, a fim de se obter uma média de células por μL (B)	37
Figura 6 – Tentativa da realização do teste de MTT por contato direto: imediatamente após o plaqueamento (A) e 24 horas após, onde se pode observar a coloração amarelada demonstrando baixo pH, conseqüentemente, morte celular (B).	37
Figura 7 – Agitador (A). Leitor universal de Elisa (B)	37
Figura 8 – Imagens representativas em microscópio invertido com lente de aumento de 10x após 48 horas dos meios em contato com as células. As setas indicam alteração celular	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da normalidade através do teste Shapiro-Wilk com relação ao teste de rugosidade	39
Tabela 2 – Teste da Análise de Variância (ANOVA) com relação ao teste de Rugosidade Superficial	40
Tabela 3 – Valores das médias e respectivos desvios padrão da rugosidade superficial. Teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias dos valores de rugosidade entre todos os grupos*	40
Tabela 4 – Distribuição da normalidade através do teste Shapiro-Wilk com relação ao teste de Microdureza Vickers	42
Tabela 5 – Teste da Análise de Variância (ANOVA) para o teste de Microdureza Vickers	42
Tabela 6 – Valores das médias e respectivos desvios padrão da microdureza Vickers. Teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias dos valores de VH entre todos os grupos*	43
Tabela 7 – Distribuição da normalidade através do teste Shapiro-Wilk com relação ao teste de resistência à Tração Diametral	44
Tabela 8 – Teste da Análise de Variância (ANOVA) com relação ao teste de resistência à Tração Diametral	44
Tabela 9 – Valores das médias e respectivos desvios padrão da resistência à tração diametral. Teste de Games-Howell para comparações múltiplas entre as médias dos valores de tração diametral (MPa) entre todos os grupos*	45
Tabela 10 – Avaliação da normalidade através do teste Shapiro-Wilk para o teste de Resistência à Compressão.....	46
Tabela 11 – Teste da Análise de Variância (ANOVA) para o teste de Resistência à Compressão	47
Tabela 12 – Valores das médias e respectivos desvios padrão da resistência à compressão. Teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias dos valores de resistência à compressão (MPa) entre todos os grupos*	47
Tabela 13 – Resultado em porcentagem da viabilidade celular dos testes de MTT e VN	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Valores das médias e desvios padrão obtidos no teste de rugosidade superficial	41
Gráfico 2 – Valores das médias e desvios padrão obtidos no teste de microdureza Vickers	43
Gráfico 3 – Valores das médias e desvios padrão obtidos no teste de tração diametral	45
Gráfico 4 – Valores das médias e desvios padrão obtidos no teste de resistência à compressão	48
Gráfico 5 – Avaliação da citotoxicidade através do teste de MTT em células Vero após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição dos meios às células. Resultados expressos como % da viabilidade celular, considerando como 100% as células que tiveram seus meios expostos às lamínulas de vidro (linha horizontal em negrito). As diferenças entre os grupos foram avaliadas através de ANOVA uma via e teste de Duncan, sendo as diferenças apontadas por símbolos diferentes (* diferença para grupo controle negativo e # para diferença dentro do próprio grupo), para valores de $p < 0,05$	51
Gráfico 6 – Avaliação da citotoxicidade através do teste de Vermelho Neutro em células vero após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição dos meios às células. Resultados expressos como % da viabilidade celular, considerando como 100% as células que tiveram seus meios expostos às lamínulas de vidro (linha horizontal em negrito). As diferenças entre os grupos foram avaliadas através de ANOVA uma via e teste de Duncan, sendo as diferenças apontadas por símbolos diferentes (* diferença para grupo controle negativo e # para diferença dentro do próprio grupo), para valores de $p < 0,05$	53

LISTA DE SIGLAS

% - porcentagem

< - menor

= igual

> - maior

± - mais ou menos

µL – microlitro

A – área

ANOVA – Análise de Variância

BHI – Brain heart infusion

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CIV – cimento de ionômero de vidro

CIVMR – Cimento de ionômero de vidro modificado por resina

CN – controle negativo

CO₂ – dióxido de carbono

CP – corpos de prova

D – diâmetro do corpo de prova

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimetilsulfóxido

DP – desvio padrão

et al. – et ali – e outros

EUA – Estados Unidos da América

g – gramas

gl – grau de liberdade

h – horas

HEMA – 2-hidroxietilmetacrilato

HV – Hardness Vickers – Microdureza Vickers

KgF – kilograma força

L. acidophilus – *Lactobacillus acidophilus*

L. casei – *Lactobacillus casei*

LED – Light Emitting Diode

Luz UV – luz ultravioleta

ml – mililitros

mm – milímetros

MPa – megapascal

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide, 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

N – newtons

n – número de repetições por grupo para cada ensaio

°C – graus Celsius

OD – densidade óptica

°GL – Gay Lussac – quantidade de mililitros de álcool absoluto contido em 100 mililitros de mistura hidro-alcoólica

p – nível de significância

pH – potencial hidrogeniônico

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Ra – rugosidade média

RC – resistência a compressão

rpm – rotações por minuto

S. mutans – *Streptococcus mutans*

S. sobrinus – *Streptococcus sobrinus*

SDH – desidrogenase succínica

Ts – resistência à tração diametral

VN – Vermelho Neutro

x – número de aumento

ZnO – óxido de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
3 METODOLOGIA	25
3.1 MATERIAIS	25
3.2 MÉTODOS	26
3.2.1 Preparo dos componentes	26
3.2.2 Confeção dos corpos de prova	28
3.2.3 Teste de Rugosidade Superficial	30
3.2.4 Teste de Microdureza Vickers	30
3.2.5 Teste de Resistência à Compressão e à Tração Diametral	31
3.2.6 Teste de Citotoxicidade	33
3.2.6.1 Cultura de células	33
3.2.6.2 Preparo dos corpos de prova	34
3.2.6.3 Ensaio de MTT: contato direto	34
3.2.6.4 Ensaio de MTT: contato indireto	34
3.2.6.5 Ensaio de Vermelho Neutro: contato indireto	35
3.2.6.6 Análise do crescimento, morfologia e viabilidade celular	38
3.2.7 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Rugosidade Superficial	39
4.2 Microdureza Vickers	42
4.3 Resistência à Tração Diametral	44
4.4 Resistência à Compressão	46
4.5 Citotoxicidade	48
4.5.1 Ensaio de MTT: contato indireto	50
4.5.2 Ensaio de Vermelho Neutro: contato indireto	52

4.5.3 Análise do Crescimento, Morfologia e Viabilidade Celular.....	52
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da PUCRS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O cimento de ionômero de vidro (CIV) é oriundo da união de dois cimentos: o cimento de policarboxilato de zinco e o cimento de silicato. O CIV combina as qualidades do cimento de silicato através da liberação de flúor e baixa alteração dimensional, com as características favoráveis do cimento de policarboxilato de zinco através da alta resistência de união à estrutura dentária. A união desses dois cimentos resultou em um cimento considerado híbrido e com ampla utilização na Odontologia (WILSON e KENT, 1972).

Apesar das excelentes propriedades do CIV, esse cimento apresenta algumas desvantagens clínicas, como tempo de trabalho curto e tempo de presa longo, solubilidade e sensibilidade à desidratação durante a geleificação, estética ruim, baixa resistência ao desgaste e rugosidade de superfície (CHARBENEAU e BOZELL, 1979; WILSON 1989).

A fim de melhorar as propriedades desfavoráveis do CIV, foram inseridos alguns componentes resinosos, surgindo então os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (MITRA, 1988). O cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) tem em sua composição os componentes tradicionais do CIV (80%) e o acréscimo de componentes resinosos (20%), sendo o mais frequente o 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) e, também, pequenas quantidades de fotoiniciadores (WILSON, 1990).

A reação de geleificação do CIVMR inicia imediatamente após a mistura do pó e líquido, através da reação ácido-base, similar ao que ocorre nos CIVs. A polimerização dos radicais livres se dá através da fotoativação, resultando em ligações cruzadas. Após a presa inicial, a reação continua lentamente através da formação de sais de alumínio, continuando a geleificar via reação ácido-base por algum tempo após o processo de polimerização ter sido completado (WILSON, 1990). Alguns sistemas, como o Vitremer, apresentam a polimerização por reação redox, sendo conhecidos como materiais de tripla polimerização ou tripla cura. Essa reação de redox propicia uma adequada presa no material com ou sem a ação do aparelho fotopolimerizador e independe da espessura do material. Assim, a reação redox causa a conversão de monômeros em polímeros, mesmo que a luz da

unidade fotopolimerizadora não consiga penetrar toda profundidade do material (MITRA e MITRA, 1991). O resultado do CIVMR após a sua presa completa é uma rede de polímero e outra rede de sais de poliacrilato, interligadas por uma matriz de poliacrilato (WILSON, 1990).

A estrutura do CIVMR, formada após sua polimerização, contribui para as excelentes propriedades descritas na literatura, tais como: resistência flexural, resistência a tração diametral, compressão, módulo de elasticidade, liberação de flúor e microdureza sendo iguais ou superiores aos CIVs (MONGKOLNAM e TYAS, 1994; MOMOI et al. 1995; LI, VON BEETZEN e SUNDSTROM, 1995; BROOKS et al., 1997).

Uma das principais vantagens do CIVMR é a sua propriedade anticariogênica através da liberação de flúor (FRIEDL et al. 1997). Devido a isso, tem-se indicado sua utilização em lesões cariosas profundas. Em cavidades profundas com ausência de sinais e sintomas de pulpíte irreversível, a dentina profunda afetada por cárie é mantida e, é forrada e/ou restaurada com CIVMR com a finalidade de evitar a exposição pulpar, preservando a vitalidade pulpar (DUQUE et al., 2009).

O tratamento de remoção incompleta do tecido cariado é baseado no conceito de que a dentina cariada é composta por duas camadas distintas: uma externa infectada e uma camada interna afetada por cárie (FUSAYAMA, 1979). Na camada externa do tecido cariado (dentina infectada), a dentina intertubular apresenta-se bastante descalcificada, fibras colágenas escassas e deterioradas e consistência amolecida. Não há processo odontoblástico e a dentina peritubular e os túbulos dentinários apresentam bactérias. A camada interna do tecido cariado (dentina afetada) apresenta-se adjacente à dentina normal, apresentando uma dentina intertubular descalcificada parcialmente e, ainda, contendo cristais de apatita. A dentina peritubular tem sua espessura diminuída mas, a rede de matriz orgânica e as células odontoblásticas estão presentes (OGUSHI e FUSAYAMA, 1975).

Assim, a camada afetada por cárie é passível de remineralização após a remoção da dentina infectada e colocação de um material biocompatível (MALTZ et al. 2002). Esse material não poderá promover danos às células odontoblásticas, que são responsáveis pela capacidade reparadora do complexo dentino-pulpar e pela formação da barreira de tecido mineralizado (ARANA-CHAVEZ e MASSA, 2004).

Entretanto, um dos maiores problemas do CIVMR é a sua citotoxicidade, onde as células odontoblásticas são as primeiras células a sofrerem danos, podendo não haver o reparo necessário da cavidade cariosa (XIE et al. 2007).

Mesmo com a reação redox, não há uma completa conversão dos monômeros em polímeros nos CIVMR. Esses monômeros podem atravessar o material restaurador e chegar a cavidade oral ou atravessar os túbulos dentinários e alcançar a polpa dental. Há uma correlação entre a quantidade de monômeros liberados e grau de citotoxicidade (GEURTSSEN, SPAHL e LEYHAUSEN, 1998).

A fim de melhorar propriedades de alguns materiais odontológicos, como a citotoxicidade, alguns trabalhos têm descrito acréscimo de substâncias ou algumas modificações em suas composições. Como por exemplo, a inclusão de metacrilato de zinco em um sistema adesivo onde se pode observar um aumento no grau de conversão de monômeros para polímeros, um aumento na capacidade antibacteriana e uma diminuição na citotoxicidade, proporcional ao acréscimo do metacrilato de zinco (HENN et al. 2011). Outra característica interessante observada foi a inibição da metaloproteinase de matriz (MMPs) (HENN et al. 2012)

As células odontoblásticas são capazes de sintetizar gelatinase A (MMP-2) durante a formação dentinária, assim, após a desmineralização dentinária, na fase da mineralização, os MMPs são sintetizados e aderidos à matriz ou aos cristais de hidroxiapatita. Entretanto, a presença do MMP pode reduzir a durabilidade da restauração adesiva pois essa enzima tem a capacidade de degradar a camada híbrida (TJADERHANE et al. 1998).

A utilização e acréscimo de ZnO nos materiais odontológicos está descrita na literatura desde 1982. Além das excelentes propriedades encontradas por Henn et al. (2011), o Zinco tem se mostrado como um potente antimicrobiano contra um grande número de bactérias, inclusive as que se encontram na cavidade oral (FANG et al. 2006; JONES et al. 2008).

Outra substância descrita na literatura como um excelente material para a utilização em casos de capeamento pulpar indireto é a Própolis. Ao ser comparada histologicamente a reação pulpar do hidróxido de cálcio, trióxido mineral agregado (MTA) e própolis, constatou-se que todos os materiais estimularam a formação da

ponte dentinária após a exposição pulpar, não apresentando diferença estatística entre si (PAROLIA et al. 2010). Os espécimes capeados com própolis exibiram menor inflamação no tecido pulpar com relação ao hidróxido de cálcio. Outros estudos, nos quais houve a inclusão do extrato de própolis ao cimento de ionômero de vidro, verificou-se uma melhora na capacidade antibacteriana (TOPCUOGLU et al. 2012) e nas propriedades mecânicas de um cimento ortodôntico (HATUNOGLU et al. 2014).

A própolis é uma mistura complexa feita por resina natural obtida pelas abelhas através da flora e substâncias liberadas pelas mesmas (WAGH, 2013). Atualmente, a própolis tem ampla utilização na área da saúde devido a sua capacidade antibacteriana (DUAILIBE, GONÇALVES e AHID, 2007; JAFARZADEH et al. 2011), antifúngica (SILICI et al. 2005), antiviral (SCHNITZLER et al. 2010) e antitumoral (AKAO et al. 2003).

Inúmeros trabalhos têm realizado modificações ou incorporações em cimento de ionômero de vidro (JEDRYCHOWSKI, CAPUTO E KERPER, 1983; YESILYURT et al. 2009; SAINULABDEEN et al. 2010; FARRET et al. 2011) e poucos em cimento de ionômero de vidro modificado por resina (SPENCER et al. 2009; DU et al. 2012; DE CASTILHO et al. 2013). Entretanto, ainda não foi encontrado um material ideal para a base de restaurações e para restaurações que apresente uma alta capacidade antibacteriana, baixa toxicidade celular e que não apresente modificações ou que apresente melhora nas suas propriedades mecânicas.

Devido à escassez de informações com relação às modificações em CIVMR, este trabalho avaliou os efeitos da inclusão de óxido de zinco ou extrato de própolis com concentrações de 10%, 20% e 30% em um cimento de ionômero de vidro modificado por resina, por meio da análise das propriedades mecânicas e da citotoxicidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Cimento de Ionômero de Vidro

As excelentes propriedades do cimento de ionômero de vidro e sua ampla utilização tornam constante a busca por melhora nas propriedades desse material.

Em **1983, Jedrychowski, Caputo e Kerper** incluíram concentrações de gluconato de clorexidina e dicloridrato de clorexidina à resina composta e ao cimento de ionômero de vidro, obtendo materiais com maior capacidade antibacteriana. A resistência à compressão, tração diametral e resistência ao cisalhamento tiveram uma redução estatística quando o material inserido foi o gluconato de clorexidina.

Duque et al. (2009) analisaram o desempenho clínico e microbiológico de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina após uma remoção incompleta de dentina cariada, utilizando como controle o cimento de hidróxido de cálcio. Os autores observaram que, após três meses de colocação do material sob a dentina cariada houve mudanças clínicas com relação à cor e consistência da dentina remanescente após a remoção dos materiais seladores. Através da análise microbiológica da dentina, constataram uma redução expressiva do número de bactérias na dentina de todos os grupos testados. Ainda assim, houve uma persistência de 33% de *S. mutans* e 26% de *S. sobrinus*.

Com a finalidade de melhorar a qualidade do tratamento restaurador atraumático, **Yesilyurt et al. (2009)** adicionaram uma mistura de antibióticos ciprofloxacina, metronidazol e minociclina ao cimento de ionômero de vidro em concentrações de 1,5%, 3% e 4,5%. Todos os grupos apresentaram um efeito inibitório significativo ao *S. mutans* e ao *L. casei*. Entretanto, apenas a menor concentração da mistura de antibiótico não diminuiu a resistência de união à dentina e à compressão.

A adição de triclosan ou clorexidina em diferentes concentrações (0,5%, 1,25% e 2,5%) em um cimento de ionômero de vidro foi testada por **Sainulabdeen et al. (2010)** em um estudo piloto. O triclosan apresentou maior efetividade do que a clorexidina contra *L. acidophilus* e *S. mutans*. Quanto maior a concentração do

triclosan, mais efetiva foi a ação antibacteriana. Os autores citam que o acréscimo de triclosan em cimento de ionômero de vidro é um material promissor; entretanto, maiores estudos são necessários.

A adição de clorexidina aos cimentos de ionômeros de vidro tem sido amplamente pesquisada. Ao adicionar o digluconato de clorexidina em concentrações de 10% e 18% ao líquido de duas marcas comerciais de ionômeros de vidro, **Farret et al. (2011)** observaram inibição de *S. mutans* sem alterar a tensão diametral, resistência compressiva e a resistência ao cisalhamento do novo material em relação ao disponibilizado pelos fabricantes. **Tüzüner et al. (2011)** adicionaram 2,5% de diacetato de clorexidina juntamente com 2,5% de cetrimida em duas marcas comerciais de cimento de ionômero de vidro. Foi observada uma inibição em *S. mutans* e em *L. casei*, sem deteriorar seriamente a dureza superficial e a liberação de flúor do material testado. Os autores sugerem que esse material desenvolvido pode ser uma alternativa para procedimentos em restaurações atraumáticas, diminuindo, assim, bactérias remanescentes.

A inclusão de nanopartículas de dióxido de titânio em um cimento de ionômero de vidro foi avaliada por **Elsaka, Hamouda e Swain (2011)**. As nanopartículas foram inseridas no pó de um cimento de ionômero de vidro nas concentrações de 3%, 5% e 7%. O grupo contendo a concentração de 3% apresentou melhora na resistência à fratura, flexural e compressiva, além de não interferir na resistência de união à dentina e nem na liberação de flúor. Os autores citam o acréscimo de 3% de dióxido de titânio como um material em potencial para a utilização de áreas de stress, como restaurações classe I e II.

Um estudo piloto (**Du et al. 2012**) investigou *in vivo* a inclusão de 2% de clorexidina em um cimento de ionômero de vidro e em um cimento de ionômero de vidro modificado por resina e o seu efeito no biofilme. Ao analisarem a vitalidade bacteriana da placa através de um microscópio confocal de varredura a *laser* e em microscópio eletrônico de varredura, verificaram que houve uma diminuição de bactérias no biofilme dental das amostras que continham o material com clorexidina após 4 e 24 horas.

Rosenberg et al. (2013) realizaram um estudo longitudinal utilizando um antimicrobiano e um CIVMR aonde após um ano demonstraram sucesso clínico em

97% dos casos. A solução de gluconato de clorexidina 2% foi utilizada previamente à inserção do CIVMR, deixando por sessenta segundos em contato com a dentina afetada por cárie, para posteriormente ser lavada e seca a cavidade, o que acaba por resultar em um procedimento clínico demorado.

Citotoxicidade

Ao modificar a composição de um material odontológico, é importante que o mesmo apresente-se biocompatível, a fim de evitar que haja destruição das células odontoblásticas, responsáveis pelo reparo da estrutura dentária (XIE et al. 2007)

Ao comparar a citotoxicidade de cinco marcas comerciais de CIVMR, **Stanislawski et al. (1999)** verificaram que o material Vitremer mostrava-se o mais citotóxico. Ao removerem o HEMA e o TEGDMA do Vitremer através de diluição, a citotoxicidade do Vitremer reduziu drasticamente. Os autores atribuem a citotoxicidade do Vitremer à liberação de monômeros residuais e não a alteração de pH do material.

Ao desenvolver um novo tipo de cimento de ionômero de vidro, **Xie et al. (2007)** compararam com diferentes CIVMR. O CIVMR Vitremer apresentou valores de viabilidade celular abaixo de 60%, o que é considerado um material citotóxico.

A inclusão de antibiótico em um cimento de ionômero de vidro modificado por resina foi descrita por **de Castilho et al. (2012)**. Foi incluído hclato de doxiciclina em porcentagens de 1,5%, 3% e 4,5% em um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (GC Fuji Lining LC). O CIVMR Vitrebond foi utilizado como controle positivo, mostrando-se um material muito citotóxico, com valor de viabilidade celular muito baixo (5,5%), com relação ao controle negativo (100%). A modificação do CIVMR não causou alterações na citotoxicidade do material, apresentando valores próximos ao controle negativo.

Em 2013, **de Castilho et al.** avaliaram a inclusão de clorexidina em 0,2%, 0,5%, 1,25% e 2,5% em um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (GC Fuji Lining LC). Os materiais modificados apresentaram um crescimento celular

normal após 24 horas de observação ao realizarem o teste de MTT. O uso de 1,25% de clorexidina no CIVMR demonstrou uma melhora no efeito antibacteriano, sem causar alterações nas propriedades mecânicas e na citotoxicidade.

Botsali et al. (2014) avaliaram compômeros e CIVMR fotopolimerizados através de diferentes unidades (LED e luz halógena). Foram avaliados os monômeros residuais liberados dos materiais, sendo identificados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. A viabilidade celular dos materiais foi realizada com células fibroblásticas e teste de MTT. Os autores verificaram que o tipo de fotopolimerizador não influenciou a liberação de HEMA ou TEGDMA. A liberação de HEMA apresentou-se em maior quantidade do que a liberação de TEGDMA. Todos os materiais apresentaram menor viabilidade celular do que o grupo controle negativo. O CIVMR fotopolimerizado com LED apresentou maiores valores de biocompatibilidade do que o fotopolimerizado com luz halógena.

Própolis

A própolis é uma substância de cera com resina produzida por abelhas a partir de uma mistura de brotos de árvores com uma glândula excretada por glândulas das abelhas. Há uma diversidade de conteúdo químico devido à diversificação da flora e das abelhas em cada localidade (KUMAR, 2014).

Ainda de acordo com **Kumar (2014)**, a própolis tem sido descrita com inúmeras propriedades biológicas tais como antibacteriana, antiviral, fungicida, anti-inflamatório, antioxidativo, anti-diabetes, radioproteção e anticâncer. Além disso, a própolis promove reorganização tecidual devido às suas características anti-inflamatórias.

Ao incluírem própolis sob a forma de extrato de própolis ou liofilizado (pó) em três cimentos de ionômero de vidro, Troca et al. (2011) observaram que apenas uma marca de CIV apresentou redução na resistência à tração diametral. Na análise de sorção houve um aumento com relação aos materiais que não foram modificados.

Topcuoglu et al. (2012) incluíram extrato de própolis a um cimento de ionômero de vidro nas concentrações de 25% e 50%. Os materiais modificados exibiram halos de inibição frente ao *S. mutans*.

Ao avaliar histologicamente a pulpotomia dentes decíduos de porcos capeados com extrato de própolis ou hidróxido de cálcio, **Ozório et al. (2012)** observaram que ambos são capazes de estimular o reparo da estrutura dentária através da formação da barreira dentinária.

De Luca et al. (2014) incluíram diferentes concentrações de própolis (5%, 10% e 15%) em um verniz. Os materiais modificados apresentaram viabilidade celular (80% de células viáveis) além de uma satisfatória atividade antimicrobiana contra bactérias cariogênicas.

O efeito da própolis adicionada ao cimento de ionômero de vidro foi testado por **Hatunoğlu et al. (2014)**. O extrato de própolis foi adicionado nas concentrações de 10%, 25% e 50% em um CIV utilizado para cimentação de bandas ortodônticas. O CIV que continha 25% e 50% apresentaram inibição ao crescimento do *S. mutans*, o que não ocorreu na concentração de 10% e no grupo controle. A resistência ao cisalhamento não apresentou diferença estatística entre os grupos.

Óxido de Zinco

O óxido de zinco tem sido descrito na literatura como medicação para diversas finalidades, como por exemplo, tratamento de câncer (ZHANG, SHAN e DONG, 2014) e medicação para diabetes (KADOWAKI et al. 2013). Outra característica importante descrita na literatura é a propriedade antibacteriana (FANG et al. 2006; JONES et al. 2008).

Osinaga et al. (2003) incluíram ao pó do Vitremer (CIVMR) e ao pó do Ketac-Fil (CIV) 5% ou 10% de sulfato de zinco. O acréscimo de Zn aos materiais resultou em uma diminuição no crescimento do *S. mutans* e aumentou a liberação de flúor. A resistência flexural e a solubilidade dos materiais modificados não apresentaram alteração significativa com relação aos grupos não modificados.

Spencer et al. (2009) avaliaram a inclusão de óxido de zinco em um cimento de ionômero de vidro modificado por resina utilizado para cimentação de bandas ortodônticas. Não houve diferenças significativas entre os grupos testados com relação ao controle quando realizado o teste de resistência ao cisalhamento. A capacidade antimicrobiana apresentou um aumento conforme maior a concentração de óxido de zinco no material. Foi observada uma duração de pelo menos um mês da capacidade antimicrobiana do material.

Henn et al. (2011) acrescentaram 1%, 2,5%, 5%, 10%, 20% ou 30% de metacrilato de zinco em uma resina experimental. Os autores observaram um aumento no grau de conversão de monômeros em polímeros em todos os grupos modificados. Os autores observaram uma correlação entre a quantidade de metacrilato de zinco e a biocompatibilidade. Quanto maior a quantidade de metacrilato de zinco na amostra, menor o dano citotóxico. Os grupos contendo 10%, 20% e 30% de metacrilato de zinco apresentaram atividade antibacteriana com relação ao *S. mutans*.

A fim de melhorar a propriedade antibacteriana do titânio, **Liu et al. (2014)** acrescentaram diferentes concentrações de óxido de Zinco a nanotubos de dióxido de titânio através de um método de tratamento hidrotérmico. Os autores observaram que o Zn era liberado dos nanotubos de uma forma constante, lenta e biologicamente aceitável. Além disso, os grupos que apresentaram as modificações conseguiram reduzir o crescimento das bactérias *S. mutans* e *P. gingivalis*, enquanto que as amostras contendo apenas titânio não conseguiram. O grupo contendo 0,015 M de óxido de zinco apresentou a maior inibição do crescimento de bactérias sem interferir na capacidade da proliferação celular.

Sais de zinco têm sido bastante utilizados em produtos para higiene dental devido à sua propriedade antibacteriana. Devido a isso, **Mohammed et al. (2014)** avaliaram os efeitos físico químicos do Zinco na desmineralização do esmalte em um estudo *in vitro*. Os autores confirmaram a redução da desmineralização do esmalte quando há presença de Zinco.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

Quadro 1 – Materiais utilizados no estudo com seus respectivos fabricantes e origem

MATERIAL	FABRICANTE	CIDADE/ESTADO/PAÍS
Álcool de cereais 96°GL	Nicola – Farmácia de Manipulação	Caçapava do Sul/RS/Brasil
Própolis	<i>Apis mellifera</i>	Caçapava do Sul/RS/Brasil
Balança de precisão AG204	Mettler Toledo	Barueri/SP/Brasil
Brain heart infusion	Merck & Co.	Whitehouse Station/Nova Jersey/EUA
Câmara de Neubauer	Optik Labor	EUA
Capela de fluxo Laminar/Luz UV	BSTEC	Canela/RS/Brasil
Centrífuga Excelsa® II	Fanem	São Paulo/Brasil
Cimento de ionômero de vidro modificado por resina	3M ESPE	St Paul/MN/EUA
Espectrofotômetro UV-2401 PC	Shimadzu	Kyoto, Japão
Estufa de cultura	Fanem LTDA	Guarulhos/SP/Brasil
Garrafas de cultura	TPP	Zollstrasse/Suíça
Lamínulas de vidro	Glasscyto	Brasil
Leitor Universal de ELISA – ELX 800	BIO-TEK Instruments	Nova Jersey/EUA
Máquina de ensaio Universal	EMIC DL 2000	São José dos Pinhais/PR/Brasil
Microdurômetro HMV	Simadzu Corp.	Kyoto/Japão
Microscópio IX73	Olympus	Coimbra/Portugal
Óxido de Zinco	Sigma-Aldrich	Steinheim/Germany
Paquímetro digital	Mitutoyo	São Paulo/SP/Brasil

Placas de cultura	Cell Wells	Nova York, EUA
Radii-cal	SDI	Victoria/Austrália
Rugosímetro	Mitutoyo	Kawasaki/Kanagawa, Japão
Seringa centrix	DFL	Rio de Janeiro/Brasil
Software IBM SPSS 22		Chicago/IL/EUA
Solução de MTT	Across Organics	Nova Jersey/EUA
Tripsina EDTA 0,1%	Gibco®	Invitrogen Corporation/Grand Island/EUA

Fonte: A autora (2014)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo dos componentes

Para a realização deste estudo foram preparados sete grupos. Para a confecção dos corpos de prova do grupo controle (grupo 7), foi mantida a formulação original, conforme quadro 2. Os grupos 1, 2 e 3 tiveram a formulação do fabricante modificada através de acréscimo do óxido de zinco. Para cada frasco do pó do Vitremer original contendo 9 g, foi acrescentado 0,9 g para o Grupo 1; 1,8 g para o Grupo 2; 2,7 g para o Grupo 3, correspondendo a 10%, 20% e 30% respectivamente, com relação ao peso (figura 1A). A pesagem dos materiais foi realizada através de uma balança de precisão.

Para a obtenção do extrato de própolis foi utilizado 100 ml de álcool 96° GL para 10 gramas de própolis. A mistura foi colocada em um frasco escuro e hermético e mantida por 48 horas. Após esse período, o extrato de própolis foi coado a fim de manter apenas a parte líquida (JAFARZADEH et al. 2011). Os grupos 4, 5 e 6 tiveram a formulação do fabricante modificada através de acréscimo de extrato de própolis ao líquido do material. Para cada frasco do líquido do Vitremer original contendo 8 ml foi acrescentado 0,8 ml de extrato de própolis para o Grupo 1; 1,6 ml para

o Grupo 2; 2,4 ml para o Grupo 3, correspondendo a 10%, 20% e 30% respectivamente, com relação ao volume (figura 1B). A mensuração dos volumes foi realizada através de uma pipeta graduada.

O quadro 3 ilustra os grupos e suas modificações. Após os acréscimos dos materiais, todos os frascos foram agitados 40 vezes.

Quadro 2 – Composição do cimento de ionômero de vidro modificado por resina que foi utilizado nesse estudo

Material	Composição
Vitremer (pó) – cor A3	Cristais de fluoroaluminossilicato de vidro, persulfato de potássio, ácido ascórbico e pigmentos.
Vitremer (líquido)	Ácido polialcenóico, grupos metacrilatos, água, HEMA e canforoquinona.

Fonte: Fabricante 3M ESPE

Quadro 3 – Grupos e suas respectivas composições com relação a adição de óxido de zinco incorporado ao pó ou extrato de própolis ao líquido do cimento de ionômero de vidro modificado por resina

Grupo	Pó do Vitremer	Óxido de Zinco	Líquido do Vitremer	Extrato de própolis
Grupo 1	9 g	0,9 g (10%)	8 ml	-
Grupo 2	9 g	1,8 g (20%)	8 ml	-
Grupo 3	9 g	2,7 g (30%)	8 ml	-
Grupo 4	9 g	-	8 ml	0,8 ml (10%)
Grupo 5	9 g	-	8 ml	1,6 ml (20%)
Grupo 6	9 g	-	8 ml	2,4 ml (30%)
Grupo 7	9 g	-	8 ml	-

Fonte: A autora (2014)

3.2.2 Confeção dos corpos de prova

Para todos os grupos e testes foram utilizados o mesmo padrão de confecção dos corpos de prova, alterando apenas o molde e as dimensões que foram específicos para cada teste. Antes da aglutinação do CIVMR, o frasco do pó e do líquido foram agitados por 20 vezes, separadamente, a fim de manter o pó e o líquido homogêneos. Foi utilizada a proporção pó/líquido de 1:2. Ao introduzir a colher dosadora recomendada pelo fabricante, a mesma foi enchida com pó e utilizado o rasador de plástico do próprio frasco para nivelar, a fim de remover o excesso de pó. O frasco do líquido foi segurado em posição vertical, colocando o orifício do mesmo para baixo, sem que a ponta tocasse na placa de vidro. As proporções foram dispensadas em uma placa de vidro e aglutinadas por 30 segundos com auxílio de uma espátula plástica. O cimento foi colocado em uma ponta aplicadora Centrix e inserido no molde de poliacetal e prensado entre duas matrizes de poliéster e placas de vidro, a fim de remover os excessos e obter uma lisura de superfície. Logo após, as amostras foram fotopolimerizadas por 40

segundos em cada face livre com auxílio de um fotopolimerizador de LED. Após a remoção do molde, os corpos de prova foram armazenados a 37°C em 100% de umidade relativa por 60 minutos. Para então serem armazenados em água destilada por 24 horas a 37°C. Antes da realização dos testes, os corpos de prova foram avaliados sendo descartados os que apresentaram qualquer tipo de falha. Os excessos foram removidos com lixa de granulação 600 e as dimensões dos corpos de prova foram mensuradas com auxílio de um paquímetro digital.

Quadro 4 – Ensaio, *n* e dimensões dos corpos de prova

Teste	<i>n</i>	Dimensões: diâmetro x espessura (mm)
Rugosidade	7	5x2
Microdureza	5	4x2
Tração diametral	12	6x3
Resistência a compressão	12	3x6
Citotoxicidade - MTT	4	10x1
Citotoxicidade – Vermelho Neutro	4	10x1

Fonte: A autora (2014)

3.2.3 Teste de Rugosidade Superficial

Para o teste de rugosidade de superfície, foram confeccionados 7 corpos de prova (5 mm de diâmetro x 2 mm de altura) para cada grupo (ATTAR, 2007). O rugosímetro foi acoplado a uma base metálica e as amostras foram estabilizadas através de uma cera utilidade, a fim de eliminar vibrações/movimentações indesejadas (figura 2B). Para obter a rugosidade média (R_a), a trajetória percorrida pela ponta foi limitada a 0,25 mm (figura 2A). Realizou-se três leituras por corpo de prova, uma ao centro de cada peça e um 1 mm para direita e 1 mm para a esquerda. Para a determinação do centro foi utilizado um paquímetro digital. As marcações laterais foram realizadas através de uma régua e lapiseira. Os resultados foram mensurados digitalmente em micrometros (μm). Após a obtenção das 3 leituras, a média foi calculada para cada corpo de prova.

3.2.4 Teste de Microdureza Vickers

Para o teste de microdureza Vickers, foram confeccionados 5 corpos de prova (4 mm de diâmetro x 2mm de altura) para cada grupo (HATANAKA et al., 2013). Utilizou-se um microdurômetro com 200 g de carga com um tempo de aplicação de 15 segundos (figura 3A). Foram realizadas 5 leituras equidistantes para cada corpo de prova. O valor calculado pelo próprio microdurômetro é realizado através da seguinte fórmula: $HV = F/A$, onde F é a força contra a superfície (kgf) e A é a área impressa na superfície, medida por suas diagonais (figura 3B). A média de dureza Vickers (HV) de cada corpo de prova foi calculada utilizando as cinco mensurações.

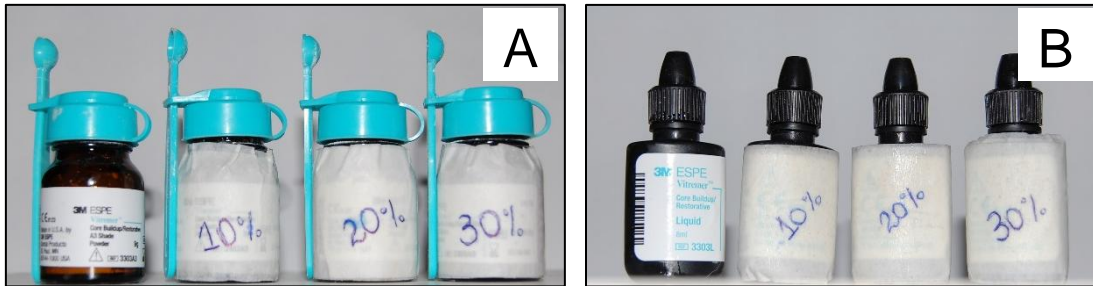
3.2.5 Teste de Resistência à Compressão e à Tração Diametral

Para a realização do teste de tração diametral e resistência à compressão, foram confeccionados 24 corpos de prova para cada grupo, sendo 12 com 6 mm de diâmetro e 3 mm de altura para a tração diametral e o restante com 3 mm de diâmetro e 6 mm de altura para a resistência compressiva (FARRET et al. 2011). Os testes foram realizados em uma máquina de ensaio universal através de uma velocidade de 1 mm/min (figura 4).

Os resultados da tração diametral foram obtidos em Newton (N) e convertidos para megaPascal (MPa), de acordo com a equação descrita por Anusavice (2005): $T_s = 2P/\pi.D.t$; onde T_s é a resistência a tração diametral, P é a força máxima obtida em N, D é o diâmetro do corpo de prova e t é a espessura, obtidos em mm.

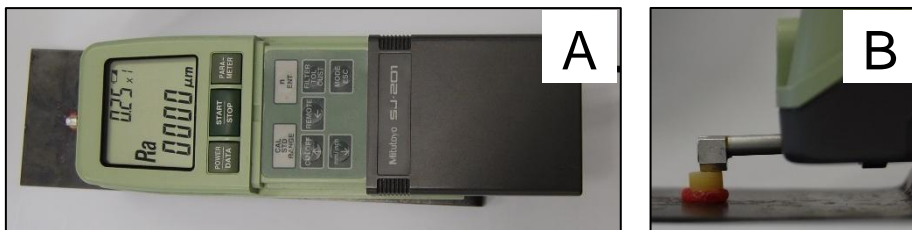
Os resultados da resistência à compressão foram obtidos em Newton (N) e convertidos para megaPascal (MPa) de acordo com a fórmula descrita por Anusavice (2005): $RC = P/\pi.R^2$; onde RC é a resistência a compressão, P a carga máxima (N) e R é o raio do corpo de prova.

Figura 1 – Diferentes proporções de óxido de zinco no frasco original do pó (A) e do extrato de própolis no frasco original do líquido (B).



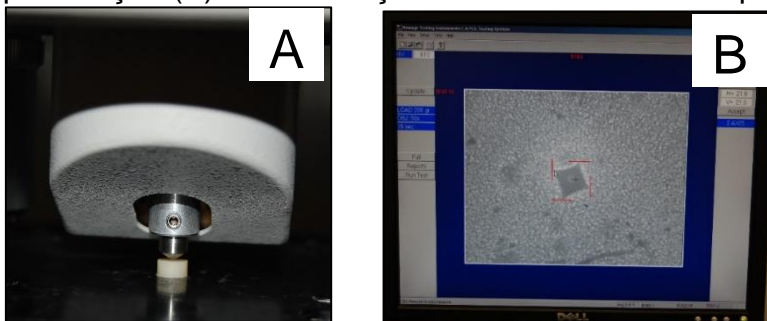
Fonte: A autora (2014)

Figura 2 – Teste de rugosidade: rugosímetro (A) e vista aproximada da ponta executando o teste (B).



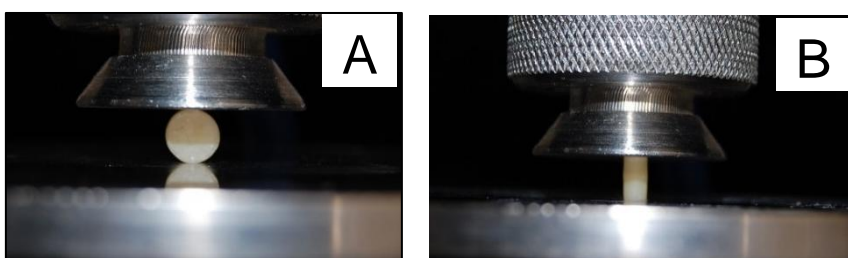
Fonte: A autora (2014)

Figura 3 – Teste de microdureza Vickers: ponta de diamante executando a penetração (A) e mensuração das medidas em computador (B).



Fonte: A autora (2014)

Figura 4 – Teste de tração diametral (A) e teste de compressão (B).



Fonte: A autora (2014)

3.2.6 Teste de Citotoxicidade

3.2.6.1 Cultura de células

Este experimento foi realizado no laboratório de citotoxicidade da Universidade Feevale. Para este experimento foi selecionada a linhagem de células VERO, uma linhagem de fibroblastos da origem de rim de macaco (ATCC-81). Inicialmente foi realizado o descongelamento das células (banco de células do laboratório de citotoxicidade da Universidade Feevale), em banho-maria a 37°C. O conteúdo foi passado para um tubo de ensaio, contendo 10 ml de meio de cultura (quadro 5) e centrifugado por cinco minutos. O precipitado foi ressuscitado e levado para garrafas de cultura, sendo acrescentado o meio de cultura (DMEM). As garrafas de cultura foram mantidas em incubadora com controle de temperatura e pressão em ambiente úmido a 37°C, em fluxo de 95% de ar e 5% de CO₂. A cada dois dias, o meio foi trocado até que as células atingissem a subconfluência.

Após a obtenção da subconfluência, visualizada em microscópio (figura 5A), as células foram lavadas com CMF (quadro 6) por três vezes, foi colocado tripsina EDTA e homogeneizada contra as paredes até descolar as células da garrafa. A seguir, o conteúdo foi colocado em um tubo falcon e foi adicionado o dobro de meio. Após a centrifugação por 10 minutos a 1200 rpm, o sobrenadante foi dispensado e foram adicionados 2 ml de meio de cultura e o sedimento foi resuspenso, sendo retirados 10 µL para a colocação na câmara de Neubauer (figura 5B). A câmara foi levada ao microscópio e foi contado o número de células nos quadrantes com 16 quadrados menores, sendo somados e divididos por quatro, obtendo-se assim, o número de células por µL.

A suspensão foi colocada em placas de 96 poços com 200 µL de densidade de 2×10^4 células por poço.

3.2.6.2 Preparo dos corpos de prova

A fim de se obter uma comparação de resultados, foi utilizado um grupo controle negativo (CN), composto por discos de lamínulas de vidro (10x1 mm), sendo este material comprovadamente não tóxico às células, resultando em um crescimento celular normal. Os demais corpos de prova foram confeccionados conforme descrito no item 3.2.2. Todos os corpos de prova foram confeccionados 48 horas antes do início dos testes. Para a esterilização dos corpos de prova foi utilizado luz UV por 60 minutos em cada face livre dos corpos de prova.

3.2.6.3 Ensaio de MTT: contato direto

Cada corpo de prova foi inserido no poço correspondente e a placa foi mantida por 24 horas em incubadora com 100% de umidade a 37°C, com 5% de CO² e 95% de ar. Após 24 horas, foi observada acidificação do meio e a morte celular foi constatada através do microscópio, com exceção do grupo controle negativo, que apresentou crescimento celular normal. Assim, esse teste tornou-se inviável devido a liberação de produtos dos corpos de prova que acidificam o meio, ocasionando a morte celular (figura 6).

3.2.6.4 Ensaio de MTT: contato indireto

Os corpos de prova foram imersos em 6 ml de meio de cultura e mantidos pelo período de 24 horas. Após esse período, foram removidos 5 ml de cada poço, sendo divididos em quatro grupos, a fim de diluí-lo: A – 100% do líquido imerso/removido (2 ml); B – 75% do líquido imerso/removido (1,5 ml) + 0,5ml de DMEM; C – 50% do líquido imerso/removido (1 ml) + 1 ml de DMEM; D – 25% do líquido imerso/removido (0,5 ml) + 1,5 ml de DMEM. As células plaqueadas tiveram seus meios removidos e acrescidos os novos meios, permanecendo em contato pelos períodos de 24 e 48 horas.

A análise do metabolismo celular foi realizada por meio da demonstração citotóxica da desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa da viabilidade mitocondrial das células, usando para isto o teste colorimétrico quantitativo do Metiltetrazolium (MTT assay). Para atingir este objetivo, os extratos foram aspirados e substituídos por 400 µL de meio de cultura DMEM. Em uma sala com pouca luz, já que a solução de MTT é sensível a luz, foram adicionados 5 µL de solução de MTT (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2(-brometo difeniltetrazolium).

As placas foram forradas com papel alumínio e incubadas por 2 horas a 37°C. Após esse período, o meio de cada poço foi removido com o auxílio de uma pipeta Pauster, sendo então aplicado 10 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido) para solubilizar os cristais a formados pela clivagem dos anéis de tetrazolium pela enzima SDH das mitocôndrias ativas, observando-se uma coloração roxa. As alíquotas foram transferidas para uma placa de leitura e, então, a conversão do produto de MTT foi mensurada através da densidade óptica (OD). Essa mensuração foi realizada por espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA (figura 7B), utilizando um comprimento de onda de 570 nm. A média da OD para o controle negativo (lamínulas de vidro) representa 100% da viabilidade celular. A viabilidade celular dos grupos testados foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{densidade óptica do grupo testado} \times 100}{\text{densidade óptica do grupo controle}}$$

3.2.6.5 Ensaio de Vermelho Neutro: contato indireto

O teste de vermelho neutro avalia a capacidade de células viáveis incorporarem esse corante e acumularem nos lisossomos, verificando a viabilidade lisossomal.

O protocolo foi igual ao teste de MTT até a remoção do meio das placas. Após a remoção do meio, foi adicionado 0,2 mL de DMEM sem soro contendo 50 µg de vermelho neutro/mL e foi mantido por 3 horas a 32°C. Após esse período, o meio foi removido e os poços lavados com tampão fosfato-salina (PBS), seguido de uma lavagem com solução de cloreto de cálcio em formaldeído (1% de CaCl₂ em

formaldeído 0,5%). A seguir foi acrescentado 0,2 ml da solução de ácido acético em etanol (1% ácido acético em 50% de etanol). Para uma completa dissolução, as amostras foram agitadas durante 10 minutos (figura 7A) e após transferidas para uma placa com 96 poços. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro de microplacas em 540 nm (figura 7B). A viabilidade celular em porcentagem foi obtida através da fórmula descrita no teste de MTT.

Quadro 5- Solução de DMEM completo

	1 L DMEM
DMEM	10 g
Bicarbonado de Sódio no. 8	2,2 g
HEPES ácido no. 25	2 g
Água de osmose	900 ml
Soro fetal bovino	100 ml
Gentamicina	280 g
Streptopenicilina	1 ml

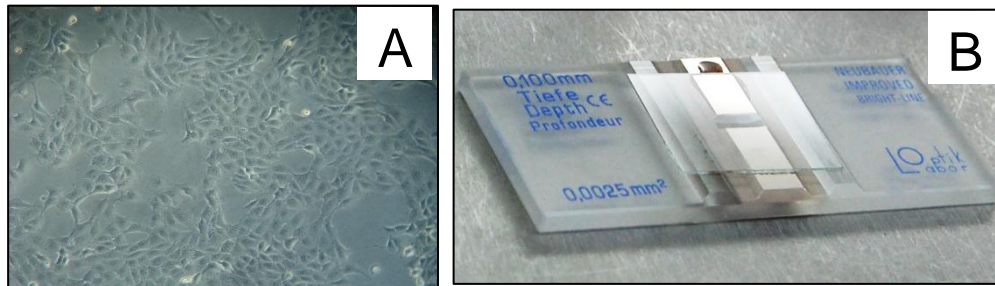
Fonte: A autora (2014)

Quadro 6 – CMF concentrado

	500 ml
NaCl	4 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	0,097 g
H ₂ O mili Q qsp	75ml
Glicose	0,55 g
Na ₂ SO ₄	0,05 g
Água destilada	400 ml

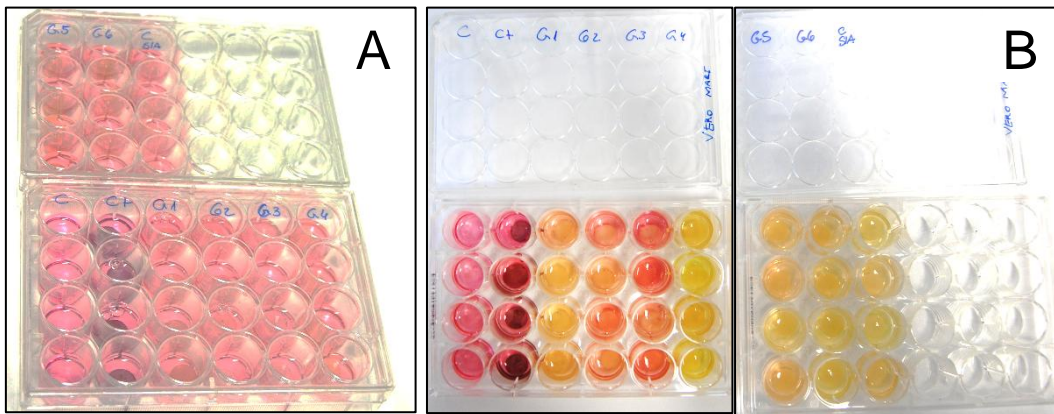
Fonte: A autora (2014)

Figura 5 – Imagem em microscópio das células em subconfluência (A). Câmara de Neubauer, utilizada para contagem de células, a fim de se obter uma média de células por μL (B).



Fonte: A autora (2014)

Figura 6 – Tentativa da realização do teste de MTT por contato direto: imediatamente após o plaqueamento (A) e 24 horas após, onde se pode observar a coloração amarelada demonstrando baixo pH, conseqüentemente, morte celular (B).



Fonte: A autora (2014)

Figura 7 – Agitador (A). Leitor Universal de Elisa (B).



Fonte: A autora (2014)

3.2.6.6 Análise do crescimento, morfologia e viabilidade celular

Após o período de 48 horas, os poços foram analisados em um microscópio de luz invertida com uma lente de aumento de 10x e foram obtidas fotografias. As análises foram realizadas por meio comparativo com relação ao grupo controle negativo.

3.2.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa *IBM SPSS 22*. A fim de avaliar normalidade dos dados, foi realizado o teste Shapiro-wilk e o teste de Levene para avaliar homogeneidade, ambos com nível de significância de 5%.

Os ensaios de rugosidade superficial, microdureza e compressão assumiram normalidade e homogeneidade, sendo realizado o teste de ANOVA um fator e teste de Tukey, a fim de identificar as diferenças entre os grupos. O teste de tração diametral apresentou seus dados normais mas não homogêneos, sendo realizado ANOVA um fator e Games-Howell como post-hoc.

Para os testes de citotoxicidade (MTT e vermelho neutro) os dados foram submetidos a ANOVA um fator e teste de Duncan, a fim de identificar as diferenças com relação ao grupo controle negativo (crescimento celular normal).

4 RESULTADOS

4.1 Rugosidade Superficial

Os valores médios de rugosidade variaram de 0,1 μm (grupo 1 e 2) a 0,22 μm (grupo 6). A distribuição de normalidade foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk, conforme tabela 1. A homogeneidade foi avaliada através do teste de Levene ($p=0,069$). Assim, os dados foram submetidos ao teste de Análise de Variância ($p = 0,0012$), conforme tabela 2. O $p < 0,05$ indicou uma diferença entre os grupos foi realizado o teste de Tukey, a fim de localizar essas diferenças (tabela 3). Os resultados estão ilustrados no gráfico 1.

Tabela 1 – Distribuição de normalidade através do teste Shapiro-Wilk com relação ao teste de rugosidade

	Significância	Valor de p
G1	0,93	0,49
G2	0,88	0,32
G3	0,89	0,33
G4	0,94	0,58
G5	0,94	0,57
G6	0,94	0,59
G7	0,92	0,46

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

Tabela 2 – Teste da Análise de Variância (ANOVA) para o teste de Rugosidade Superficial

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade (gl)	Soma média dos quadrados	Significância
Entre os grupos	0,01689	6	0,00281	0,0012
Dentro dos grupos	0,02511	42	0,00060	
Total	0,04200	48		

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

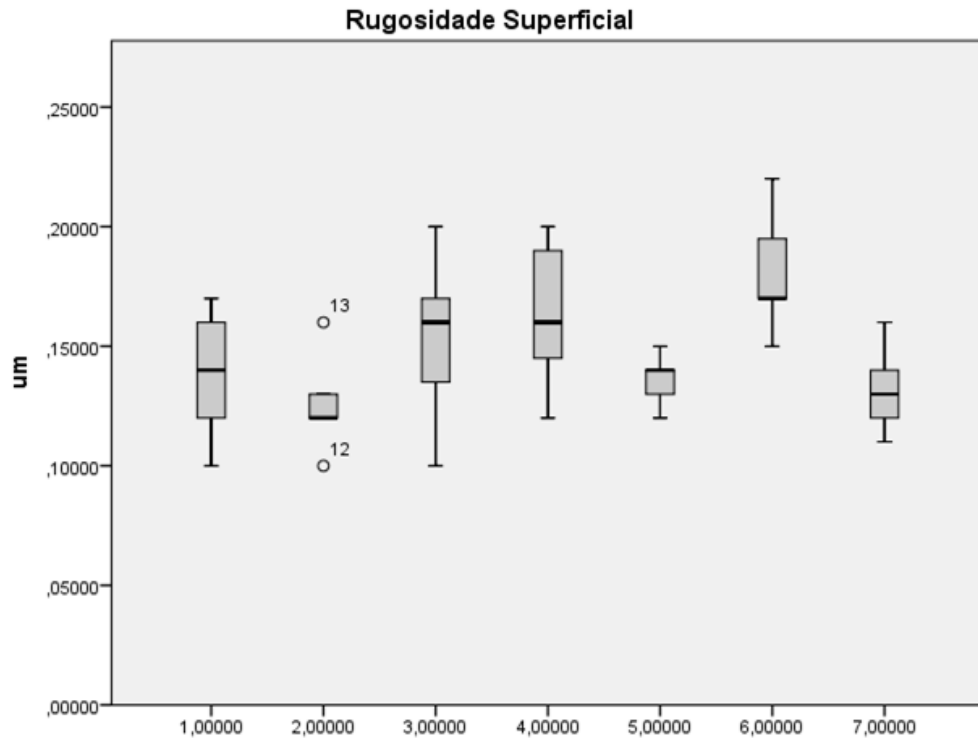
Tabela 3 – Valores das médias e respectivos desvios padrão da rugosidade superficial. Teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias de rugosidade entre todos os grupos*

Grupo	Média	Desvio padrão
6	0,18 ^a	0,02
4	0,16 ^{ab}	0,03
3	0,15 ^{ab}	0,03
1	0,14 ^b	0,03
5	0,13 ^b	0,01
7	0,13 ^b	0,02
2	0,12 ^b	0,02

Fonte: Autora da pesquisa, 2014

* Médias seguidas de letras diferentes representam diferença estatística significativa ao teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Gráfico 1 - Valores das médias e desvios padrão obtidos no teste de rugosidade superficial.



Fonte: Autora da pesquisa, 2014

4.2 Microdureza Vickers

A distribuição de normalidade foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk, conforme tabela 4. Depois de constatada a normalidade, a homogeneidade entre grupos foi avaliada através do teste de Levene ($p = 0,617$). Os dados foram submetidos ao teste de Análise de Variância, sendo o $p = 0,000$ (tabela 5), assim, foi realizado o teste de Tukey (tabela 6), a fim de identificar as diferenças entre os grupos. Os resultados estão ilustrados no gráfico 2.

Tabela 4 – Distribuição de normalidade através do teste Shapiro-Wilk para o teste de Microdureza Vickers

	Significância
G1	0,94
G2	0,79
G3	0,86
G4	0,78
G5	0,92
G6	0,77
G7	0,78

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

Tabela 5 – Teste da Análise de Variância (ANOVA) para o teste de Microdureza Vickers

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade (gl)	Soma média dos quadrados	Significância
Entre os grupos	3.315,620	6	552,6	0,000
Dentro dos grupos	1.376,75	35	39,33	
Total	4.692,371	41		

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

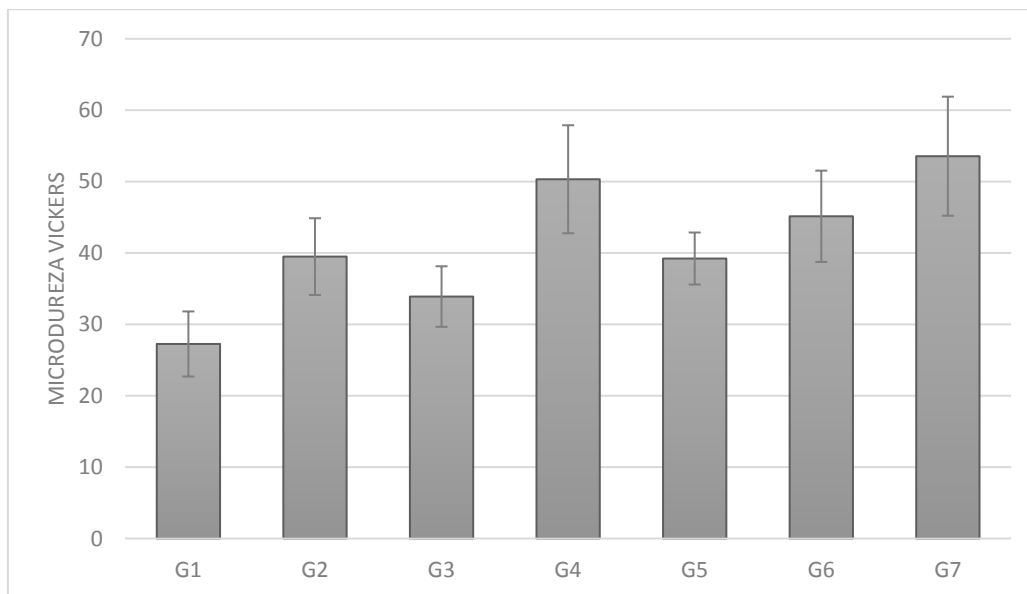
Tabela 6 – Valores das médias e respectivos desvios padrão da microdureza Vickers. Teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias dos valores de VH entre todos os grupos*

Grupo	Média de VH	Desvio padrão
7	53,53 ^a	8,34
4	50,30 ^a	7,56
6	45,12 ^{ab}	6,39
2	39,47 ^{abc}	5,37
5	39,20 ^{bcd}	3,64
3	33,88 ^{cd}	4,23
1	27,24 ^d	4,56

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

* Médias seguidas de letras diferentes representam diferença estatística significativa ao teste de Tukey ao nível de significância de 5%

Gráfico 2 - Valores das médias e desvios padrão obtidos no teste de microdureza Vickers.



Fonte: Autora da pesquisa (2014)

4.3 Resistência à Tração Diametral

A distribuição de normalidade foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk, conforme tabela 7. Depois de constatada a normalidade, a homogeneidade entre grupos não foi constatada através do teste de Levene ($p = 0,002$). Assim, os dados foram submetidos ao teste de Análise de Variância, sendo $p = 00$ (tabela 8), foi realizado o teste de Games-Howell, a fim de identificar as diferenças entre os grupos (tabela 9). Os resultados estão ilustrados no gráfico 3.

Tabela 7 – Distribuição de normalidade através do teste Shapiro-Wilk para o teste de resistência à Tração Diametral

	Significância
G1	0,89
G2	0,94
G3	0,91
G4	0,94
G5	0,95
G6	0,73
G7	0,94

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

Tabela 8 – Teste da Análise de Variância (ANOVA) com relação ao teste de Tração Diametral

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade (gl)	Soma média dos quadrados	Significância
Entre os grupos	240,171	6	135,138	,000
Dentro dos grupos	350,280	70	10,535	
Total	590,452	76	145,673	

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

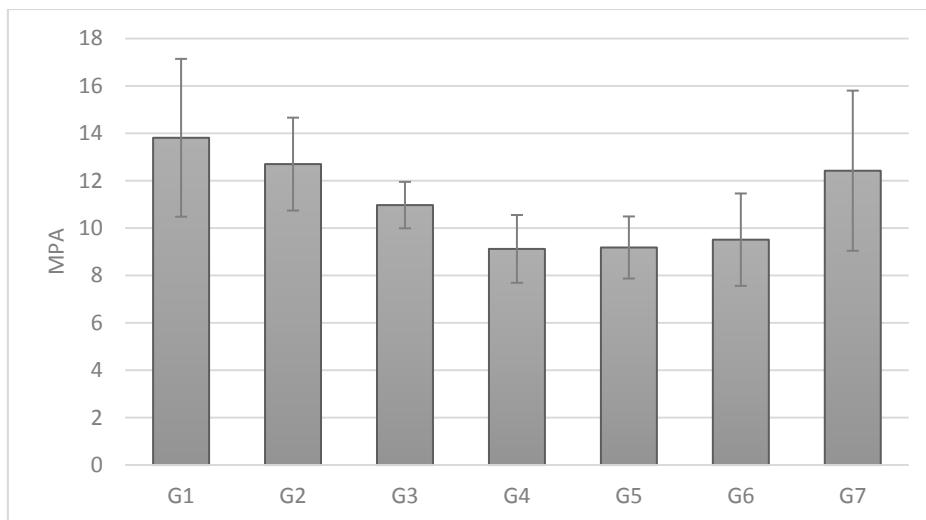
Tabela 9 – Valores das médias e respectivos desvios padrão da resistência à tração diametral. Teste de Games-Howell para comparações múltiplas entre as médias dos valores de tração diametral entre todos os grupos*

Grupo	Média	Desvio padrão
1	13,81 ^a	3,33
2	12,70 ^a	1,95
7	12,42 ^{a^c}	3,38
3	10,97 ^{ab}	0,98
6	9,51 ^{bc}	1,96
5	9,18 ^c	1,32
4	9,12 ^c	1,43

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

* Médias seguidas de letras diferentes representam diferença estatística significativa ao teste de Games-Howell ao nível de significância de 5%

Gráfico 3 - Valores das médias e desvios padrão obtidos no teste de tração diametral.



Fonte: Autora da pesquisa (2014)

4.4 Resistência à Compressão

A distribuição de normalidade foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk, conforme tabela 10. Depois de constatada a normalidade, a homogeneidade entre grupos foi constatada através do teste de Levene ($p = 0,053$). Assim, os dados foram submetidos ao teste de Análise de Variância sendo $p = 0,04$ (tabela 11), sendo realizado o teste de Tukey, a fim de identificar as diferenças entre os grupos (tabela 12). Os resultados estão ilustrados no gráfico 4.

Tabela 10 – Distribuição de normalidade através do teste Shapiro-Wilk para o teste de Resistência à Compressão

	Significância
G1	0,91
G2	0,92
G3	0,92
G4	0,92
G5	0,84
G6	0,86
G7	0,94

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

Tabela 11 – Teste da Análise de Variância (ANOVA) para o teste de Resistência à Tração Diametral

	Soma dos quadrados	Grau de liberdade (gl)	Soma média dos quadrados	Significância
Entre os grupos	613,731	6	102,289	,004
Dentro dos grupos	1.996,124	70	28,516	
Total	2.609,856	76		

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

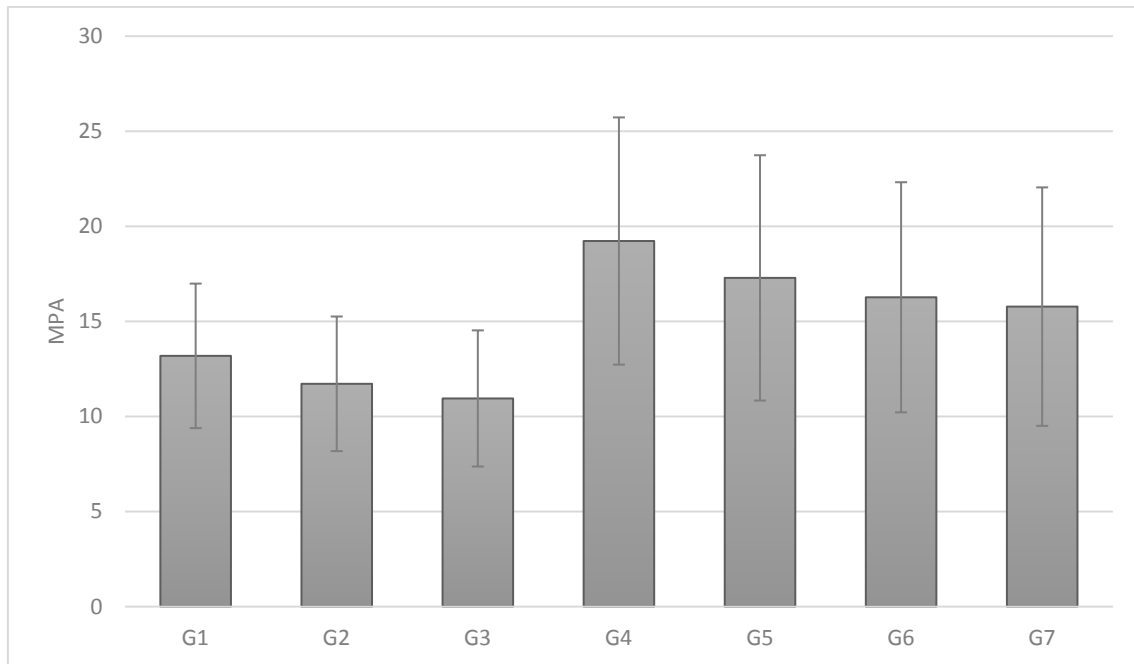
Tabela 12 – Valores das médias e respectivos desvios padrão da resistência à compressão. Teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias dos valores do teste de compressão (MPa) entre todos os grupos*

Grupo	Média	Desvio padrão
4	19,23 ^a	6,5
5	17,29 ^{ab}	6,45
6	16,27 ^{ab}	6,05
7	15,78 ^{ab}	6,27
1	13,19 ^{ab}	3,8
2	11,72 ^b	3,54
3	10,95 ^b	3,58

Fonte: Autora da pesquisa (2014)

* Médias seguidas de letras diferentes representam diferença estatística significativa ao teste de Tukey ao nível de significância de 5%

Gráfico 4 - Valores da média e desvio padrão obtidos no teste de resistência à compressão.



Fonte: Autora da pesquisa (2014)

4.5 Citotoxicidade

O cálculo em porcentagem da viabilidade celular obtida pelo teste de MTT e Vermelho Neutro está demonstrado na tabela 13, onde CN é o controle negativo para citotoxicidade (lamínula de vidro).

Tabela 13 – Resultado em porcentagem da viabilidade celular

Grupo/Diluição	MTT 24h (%)	MTT 48h (%)	VN 24h (%)	VN 48h (%)
CN	100	100	100%	100%
G1 – 25%	92,76	87.99	132,15	111.74
G1 – 50%	95,93	73.31	123,05	103.12
G1 – 75%	100,16	71.25	97,38	122.64
G1 – 100%	78,5	68.14	99,02	100.02
G2 – 25%	80,35	78.06	110,78	105.33
G2 – 50%	84,16	103.98	129,94	120.90
G2 – 75%	110,89	127.38	122,36	109.34
G2 – 100%	120,04	107.06	116,64	108.69
G3 – 25%	96,38	63.55	100,57	112.59
G3 – 50%	91,23	63.20	98,84	99.13
G3 – 75%	86,14	59.88	101,91	97.02
G3 – 100%	77,11	62.90	103,23	102.21
G4 – 25%	107,51	94.64	111,21	117.82
G4 – 50%	106,73	90.63	113,83	105.92
G4 – 75%	94,02	82.22	92,77	108.25
G4 – 100%	109,41	73.72	99,69	103.76
G5 – 25%	103,55	70.84	131,29	106.80
G5 – 50%	73,36	72.47	129,32	166.90
G5 – 75%	65,49	73.11	110,5	106.33
G5 – 100%	69,04	79.16	113,95	120.74
G6 – 25%	77,81	85.35	93,36	108.98
G6 – 50%	85,22	99.97	105,17	98.194
G6 – 75%	108,71	133.08	97,33	104.98
G6 – 100%	64,48	88.02	107,00	108.25
G7 – 25%	50,26	67.44	113,104	109.94
G7 – 50%	43,42	60.29	110,69	106.93
G7 – 75%	44,88	63.35	101,58	105.40
G7 – 100%	41,83	51.91	96,88	98.76

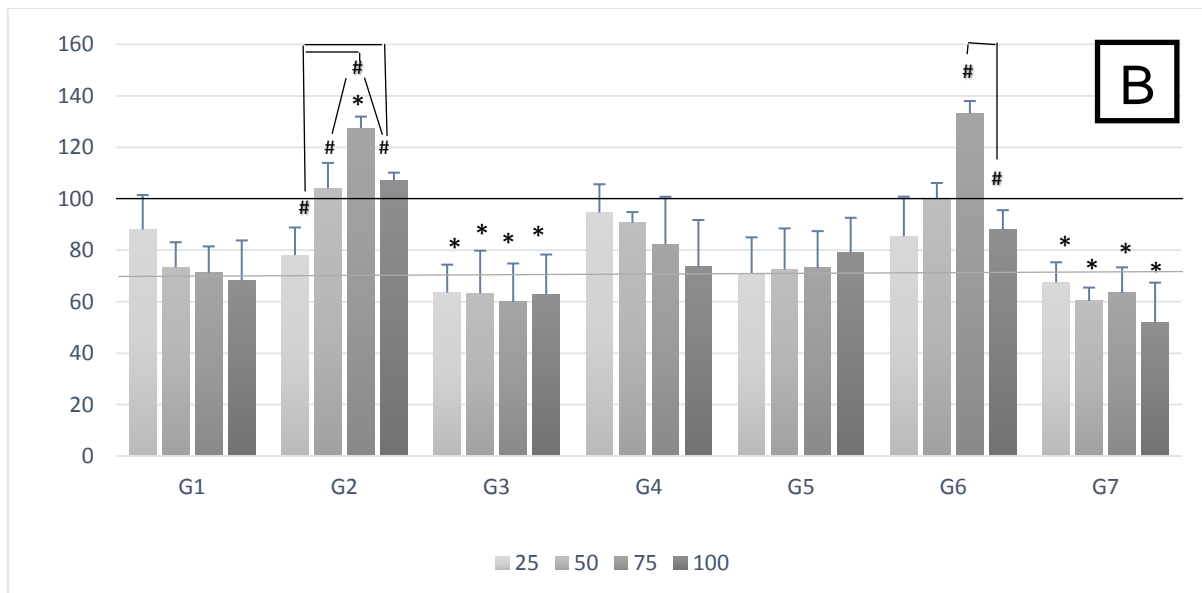
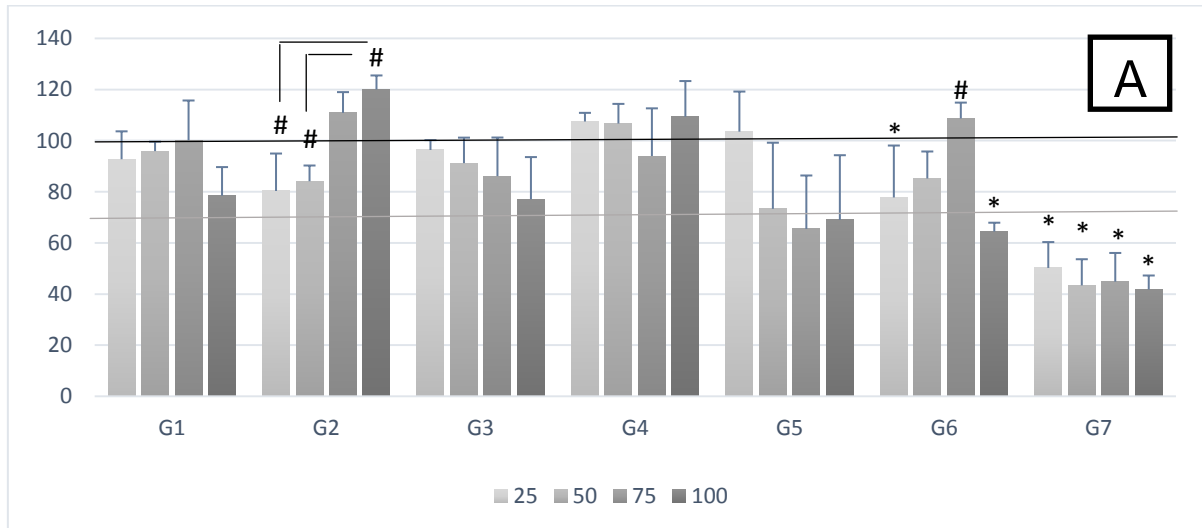
Fonte: Autora da pesquisa, 2014

4.5.1 Ensaio de MTT: contato indireto

Conforme apresentado no gráfico 5A, após 24 horas, os resultados mostraram que os grupos 6 (concentração em 25% e 100%) e o grupo 7 apresentaram um efeito citotóxico nas células, diferindo estatisticamente do crescimento celular normal, para $p < 0,05$. O grupo 5 (concentração de 75%) apresentou valores abaixo de 70%, apresentando uma tendência à citotoxicidade, mas não relevante estatisticamente. Os maiores valores encontrados foram no grupo 2 (concentração em 75% e 100%).

Após 48 horas (gráfico 5B), o grupo 7 apresentou um pequeno aumento na viabilidade celular, mas ainda abaixo dos 70% e estatisticamente inferior ao controle de crescimento celular normal. O grupo 3 apresentou também valores abaixo do crescimento celular normal em todas as diluições. O grupo 2 (concentrações em 50%, 75% e 100%) e o grupo 6 (concentração em 75%) apresentaram os maiores valores.

Gráfico 5 – Avaliação da citotoxicidade através do teste de MTT em células vero após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição do meio às células. Resultados expressos como % da viabilidade celular, considerando como 100% as células que tiveram seus meios expostos às lamínulas de vidro (linha horizontal em negrito). Resultados abaixo de 70% apresentam uma tendência à citotoxicidade (linha horizontal cinza). As diferenças entre os grupos foram avaliadas através de ANOVA uma via e teste de Duncan, sendo as diferenças apontadas por símbolos diferentes (* diferença para grupo controle negativo e # para diferença dentro do próprio grupo), para valores de $p < 0,05$.



Fonte: Autora da pesquisa (2014)

4.5.2 Ensaio de Vermelho Neutro: contato indireto

Conforme gráfico 6A, nos resultados obtidos com o ensaio de VN após 24 horas, todos os grupos e diluições não apresentaram um indicativo de efeitos citotóxicos. A concentração de 50% do grupo 2 e 5 apresentaram resultados superiores aos demais, considerando $p < 0,05$. Após 48 horas, todos os grupos e diluições não indicaram dano lisossomal (gráfico 6B). O grupo 4 na concentração de 25% apresentou valor superior ao controle negativo.

4.5.3 Análise do Crescimento, Morfologia e Viabilidade Celular

As imagens representativas obtidas em microscópio com lente de aumento de 10x após 48 horas dos meios em contato com as células demonstram que os grupos 1 e 2 apresentaram um crescimento, morfologia e viabilidade mais parecidos com o controle negativo do que os demais grupos. Os grupos 6 e 7 apresentaram maior quantidade de células alteradas, conforme apontam as setas (figura 8).

Gráfico 6 – Avaliação da citotoxicidade através do teste Vermelho Neutro em células vero após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição dos meios às células. Resultados expressos como % da viabilidade celular, considerando como 100% as células que tiveram seus meios expostos às lamínulas de vidro (linha horizontal em negrito). As diferenças entre os grupos foram avaliadas através de ANOVA uma via e teste de Duncan, sendo as diferenças apontadas por símbolos diferentes (* diferença para grupo controle negativo e # para diferença dentro do próprio grupo), para valores de $p < 0,05$.

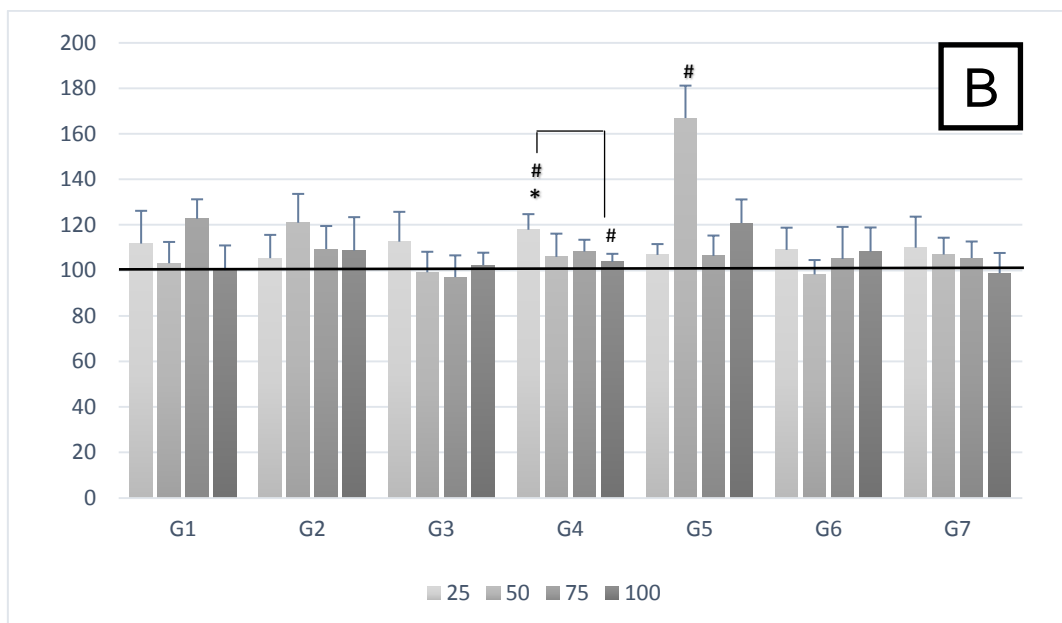
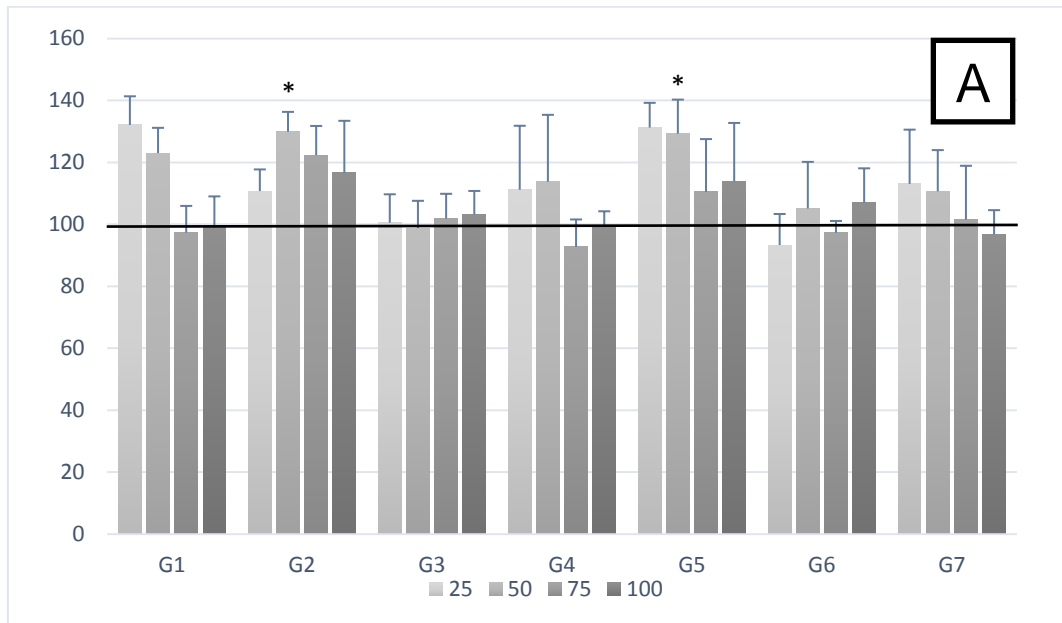
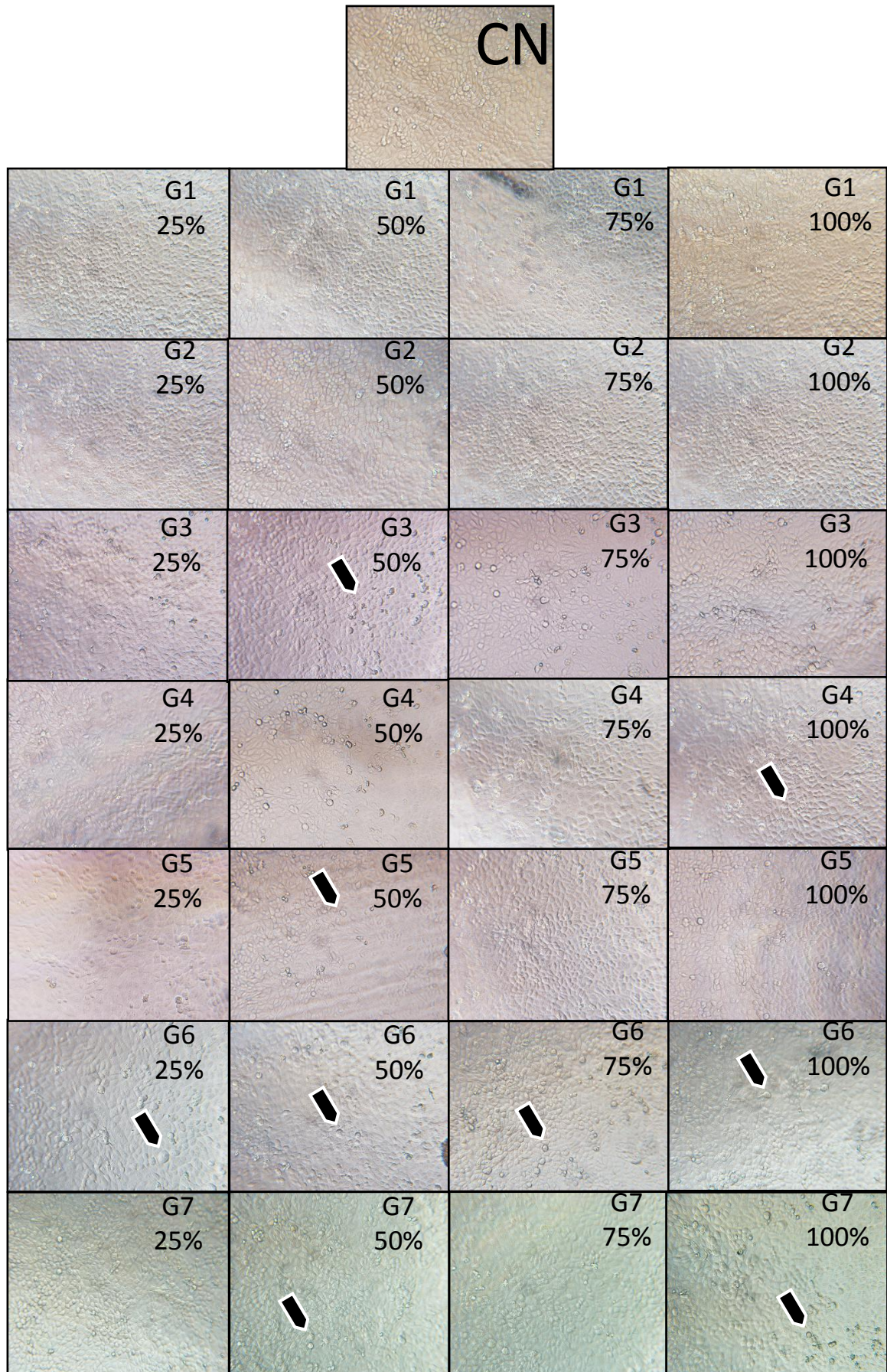


Figura 8 – Imagens representativas em microscópio invertido .com lente de aumento de 10x após 48 horas dos meios em contato com as células. As setas indicam alteração celular.



5 DISCUSSÃO

Os cimentos de ionômero de vidro modificado por resina têm sido amplamente utilizados devido à melhora de suas propriedades com relação ao cimento de ionômero de vidro convencional (MONGKOLNAM e TYAS, 1994; MOMOI, HIROSAKI e McCABE, 1995; LI, VON BEETZEN e SUNDSTROM, 1995; BROOKS et al., 1997).

Uma das principais funções do CIVMR é servir como liner ou base de restaurações. Tem sido descrito na literatura um tratamento onde a dentina afetada por cárie permanece na cavidade, a fim de evitar a exposição pulpar, colocando sob a região material que estimule o reparo da dentina afetada (MALTZ et al. 2002). Um dos materiais utilizados nessa técnica é o CIVMR (ROSENBERG et al. 2013). Entretanto, um problema relatado na literatura com relação aos CIVMR é a citotoxicidade desse material. Devido a isso, o reparo necessário do tecido afetado por cárie pode não ocorrer em decorrência da não sobrevivência das células odontoblásticas (XIE et al.2007).

A fim de diminuir a citotoxicidade do CIVMR e melhorar suas propriedades mecânicas, optou-se pela inclusão de extrato de própolis em seu líquido. Esse material foi escolhido em decorrência de ser um antimicrobiano natural, com excelentes propriedades relatadas na literatura (WAGH, 2013). O óxido de zinco também foi incluído neste estudo por ter trabalhos com materiais a base de zinco onde foi descrito uma melhora na capacidade antimicrobiana e citotoxicidade (HENN et al. 2011). Outro fator importante descrito na literatura com relação ao zinco, é a

capacidade de inibir a matriz de metaloproteinases (MMPs) o que pode resultar em restaurações com maior longevidade (HENN et al. 2012).

A rugosidade superficial tem sido relacionada ao desgaste do material, doenças periodontais, desenvolvimento de cáries secundárias, devido a formação de biofilme em áreas com maior rugosidade. A possibilidade de maior acúmulo de biofilme em áreas de maior rugosidade pode ser explicada pela dificuldade de higiene no local e pelas bactérias estarem protegidas da ação das forças de cisalhamento (TEUGHELIS et al. 2006). Ainda de acordo com esse autor, valores superiores a $0,2 \mu\text{m}$ facilitam a formação de biofilme. Neste trabalho o maior valor encontrado foi no grupo 6, sendo o valor médio de $0,22 \mu\text{m}$, o qual foi o único grupo que diferiu estatisticamente do grupo 7, grupo que não foi modificado a composição original do fabricante ($p = 0,007$).

Ao mensurar a rugosidade de superfície do Vitremer, Hamouda (2011) encontrou valor médio de $0,1 \mu\text{m}$ enquanto nesse trabalho foi encontrado $0,13 \mu\text{m}$, apesar da utilização de metodologias diferentes. Korkmaz et al. (2013) ao incorporarem diacetato de clorexidina e cetramida em um cimento de ionômero de vidro convencional, observaram aumento significativo na rugosidade superficial dos materiais modificados. Neste trabalho, apenas a maior concentração de extrato de própolis (grupo 6) aumentou a rugosidade superficial.

Ao avaliar a microdureza superficial, o grupo 7 apresentou média superior ($53,53 \pm 8,34 \text{ VH}$) ao trabalho de Attin, Vataschki e Hellwig (1996) aonde o Vitremer apresentou uma média de $41,4 \pm 3,0 \text{ VH}$, mas similar ao trabalho de Wilde et al. (2006) onde o Vitremer apresentou uma média de $55,26 \pm 8,49 \text{ VH}$ após o armazenamento por 24 horas em saliva.

O grupo 7 apresentou valores superiores, mas sem apresentar diferença estatística do grupo 2, 4 e 6. O grupo 1, onde houve o acréscimo de 10% de óxido de zinco ao pó do Vitremer apresentou o menor valor. Farret et al. (2011) ao acrescentar 10 ou 18% de digluconato de clorexidina em dois tipos de cimento de ionômero de vidro para cimentação de bandas ortodônticas, observaram um aumento na microdureza Vickers nos materiais modificados, contrariamente ao que ocorreu neste estudo. Elsaka, Hamouda e Swain (2011) acrescentaram nanopartículas de dióxido de titânio em um cimento de ionômero de vidro convencional na concentração de 3%, 5% e 7% ao pó do material e observaram um decréscimo no VH de todos os materiais modificados.

A média da resistência à tração diametral apresentou-se inferior ($12,42 \pm 3,38$ MPa) com relação ao trabalho de Uno, Finger e Fritz (1996), onde o Vitremer apresentou uma média de $18 \pm 1,6$ MPa. Não houve diferença estatística entre os grupos testados com relação ao Vitremer não modificado. O acréscimo de óxido de zinco nas concentrações de 10 e 20% resultou em um indicativo de aumento da resistência à tração, mas sem significância estatística. Os grupos onde houve o acréscimo de extrato de própolis apresentaram os menores valores, mas também sem diferença estatística significativa com relação ao grupo que não teve alteração em sua composição. Troca et al. (2011) ao incluírem extrato de própolis ou própolis liofilizado a três cimentos de ionômero de vidro observaram também uma redução na tração diametral de todos os grupos.

O contrário ocorreu para a resistência à compressão, onde houve um aumento na média dos grupos 4, 5 e 6, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao grupo 7. Os grupos onde houve o acréscimo de óxido de zinco apresentaram os menores valores, e, os grupos onde houve o

acréscimo do extrato de própolis apresentaram os maiores valores. O aumento das proporções de antimicrobiano produziu uma redução nas médias dos grupos.

De Castilho et al. (2013) realizaram a inclusão de 0,2%, 0,5% 1,25% e 2,5% de digluconato de clorexidina em um cimento de ionômero de vidro modificado por resina e verificaram uma diferença estatística no teste de resistência à compressão apenas para o grupo onde foi acrescentado 2,5% com relação ao grupo não modificado. O trabalho de Farret et al. (2012) já descrito anteriormente, também não encontrou diferença estatística entre os grupos modificados e os grupo de cimento de ionômero de vidro não modificados.

A biocompatibilidade dos materiais tem sido testada através da habilidade das células viverem e crescerem quando em contato com esses materiais ou com produtos liberados por eles (CIAPETTI et al. 1996). Os testes *in vitro* são testes rápidos, sensíveis, econômicos e menos controversos quando comparados aos testes *in vivo* (ROGERO et al. 2003).

Na odontologia, o ensaio mais comum para a análise da citotoxicidade ou viabilidade celular é o teste metil tetrazólio (MTT). Entretanto, o corante de MTT penetra nas mitocôndrias de células viáveis e é clivado pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais de formazan, sendo assim, nesse teste, apenas é mensurada a viabilidade das mitocôndrias.

O corante do teste do vermelho neutro consegue atravessar a membrana celular através da permeabilidade normal da membrana fixando-se aos lisossomos, permitindo assim, uma membrana intacta e uma avaliação da viabilidade lisossomal. Quando o material testado é citotóxico para as células, a integridade da membrana é comprometida, podendo romper e liberar o corante, ocasionando a lise e morte

celular (CIAPETTI et al. 1996). Ao analisar a viabilidade celular por dois testes diferentes, estamos avaliando diferentes aspectos funcionais das células.

Na tentativa do teste do MTT por meio direto houve a acidificação do meio que também foi descrita no trabalho de Stanislowski et al. (1999). Esses autores sugerem que o Vitremer acidifica o meio através da liberação de componentes ácidos. Essa acidificação tornou o ensaio inviável.

As diferentes diluições utilizadas nos testes de citotoxicidade por meio indireto foram realizadas com a finalidade de simular a dissolução do material na cavidade oral e organismo, e a resposta das células frente a elas. Não se pode detectar, através dos resultados obtidos, relação entre diluição e citotoxicidade. A possível explicação é devido aos diferentes componentes do material, que podem, cada um se sobrepôr em diferentes diluições, como a liberação de substância tóxica se sobrepôr a substância protetora e vice-versa.

Os resultados do ensaio de MTT por contato indireto indicam um aumento da atividade mitocondrial no grupo 2 (concentração de 75% e 100%), e após 48 horas, nos grupos 2 e 6. O grupo que apresentou os menores valores foi o que não demonstrou alteração na composição do fabricante. Xie et al. (2007) ao realizar o teste de MTT em diferentes cimentos de ionômero de vidro encontraram valores abaixo de 60% ($55,8 \pm 3,2$) para a viabilidade celular do Vitremer, corroborando com os achados deste trabalho, onde o meio que esteve em contato com o material (sem diluição) apresentou $51,91 \pm 15,45$.

De Castilho et al. (2013) ao incluírem antibiótico em um CIVMR também observaram no teste de MTT um crescimento celular normal nos materiais modificados após 24 horas de observação. Esse fato pode ser explicado pelo

acréscimo dos antimicrobianos, que resulta na diminuição da quantidade de HEMA (hidroxietil metacrilato) nos corpos de prova. Stanislawski *et al.* (1999) encontraram o Vitremer como um dos cimentos mais citotóxicos entre os vários cimentos de ionômero de vidro modificados por resina testados. Esses autores atribuem a citotoxicidade desse material ao HEMA liberado. Ao analisar o teste de MTT, podemos deduzir que subprodutos liberados pelo CIVMR podem afetar a viabilidade mitocondrial das células, mas não a viabilidade lisossomal. Os demais grupos testados, não afetam a viabilidade mitocondrial, nem a lisossomal.

A importância da realização de dois testes de citotoxicidade nos mostra que um material com indícios citotóxicos no teste de MTT, como no caso do Vitremer, não pode indicar a morte celular, já que apresentou valores de viabilidade lisossomal no teste Vermelho neutro. Essa organela apresentando vitalidade é capaz de estimular o reparo do dano promovido na célula.

As imagens representativas no microscópio nos mostram que os grupos 6 (concentração de 75%) e 7 (concentração de 100%) apresentaram células mortas. Os grupos 1 e 2 foram os que apresentaram células similares ao grupo controle das lamínulas de vidro. Além disso, pode-se observar que não houve alteração no crescimento e morfologia celular em nenhum dos grupos.

Apesar dos testes mostrarem resultados promissores quanto a inclusão de óxido de zinco e extrato de própolis, algumas considerações devem ser mencionadas. A incorporação do óxido de zinco ao pó, tornou a manipulação mais difícil. Já a incorporação do extrato de própolis tornou-a mais fácil, com relação ao material que não houve modificação. É necessário maior atenção a fim de obter a consistência adequada. Outro fator importante a ser considerado é a alteração de cor. A inclusão de óxido de zinco tornou os corpos de prova mais brancos, enquanto

a inclusão do extrato de própolis alterou a cor para um amarelado. Essas dificuldades também foram observadas no trabalho de Troca et al. (2011) ao modificar os cimentos de ionômero de vidro com própolis verde. Esses autores ressaltam que a alteração de cor não irá comprometer uma restauração estética, caso esses materiais modificados sejam utilizados como liner ou base.

É importante ressaltar que este estudo *in vitro*, apesar de apresentar resultados promissores, é limitado, sendo necessário mais estudo de suas propriedades como sorção e solubilidade, resistência flexural, resistência à microtração, ao cisalhamento, assim como testes microbiológicos e testes *in vivo*. Trabalhos futuros também seriam interessantes na inclusão do primer do Vitremer ou em agentes de limpeza de superfície, previamente à inserção do CIVMR.

6 CONCLUSÕES

Considerando as limitações de um estudo *in vitro*, pode-se concluir:

- Todos os grupos que tiveram sua composição modificada apresentaram valores similares ou superiores na viabilidade celular, ao realizar os testes de citotoxicidade de MTT e Vermelho Neutro;

- O grupo 6, que apresenta 30% de extrato de própolis em seu líquido, apresentou a maior média de rugosidade superficial (0,18 μm) diferindo estatisticamente do grupo 7 (composição não modificada). Os demais grupos testados não apresentaram diferença estatística com relação ao grupo 7;

- Com relação à microdureza superficial, os grupos 2, 4 e 6 não apresentaram diferença estatística com relação ao grupo 7;

- Na resistência à compressão e à tração diametral não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao grupo controle;

- Os grupos 2 e 4 não apresentaram modificações nas propriedades mecânicas testadas com relação ao grupo controle. Nos testes de citotoxicidade se mostraram superiores ao grupo controle e similares ao controle negativo.

REFERENCIAS

AKAO, Y. et al. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 26, n. 7, p.1057-9, jul. 2003.

ANUSAVICE, K.J. Phillips Science of dental materials. 11th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2005.

ARANA-CHAVEZ VE; MASSA LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, n. 8, p.1367–73, aug. 2004.

ATTAR N. The effect of finishing and polishing procedures on the surface roughness of composite resin materials. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 8, n.1, p. 27-35, Jan. 2007.

ATTIN T; VATASCHKI M; HELLWIG E. Properties of resin-modified glass-ionomer restorative materials and two polyacid-modified resin composite materials. **Quintessence International**, v. 27, n. 3, p. 203-9. Mar. 1996

BOTSALI, MS et al. Residual HEMA and TEGDMA Release and Cytotoxicity Evaluation of Resin-Modified Glass Ionomer Cement and Compomers. **The Scientific World Journal**, 2014; 2014:218295.

BROOKS, ES et al. Manipulation effects on fluoride release from chemically-cured and resin-modified glass ionomers. **American Journal of Dentistry**. v. 10, n. 3, p. 120-22, jun. 1997.

CHARBENEAU GT; BOZELL RR 3rd. Clinical evaluation of a glass ionomer cement for restoration of cervical erosion. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 98, n. 6, p. 936-39, jun. 1979

CIAPETTI G. et al. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, n. 13, p. 1259-64. 1996.

DE CASTILHO, A.R. et al. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 2, p.131-38, sep. 2011.

DE CASTILHO, A.R. et al. In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. **Journal of Dentistry**, v. 41, n.2, p.155-63, feb. 2013.

DE LUCA, M.P. et al. Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. **BioMed Research International**, doi: 10.1155/2014/348647, May. 2013.

DU, X. et al. Inhibition of early biofilm formation by glass-ionomer incorporated with chlorhexidine in vivo: a pilot study. **Australian Dental Journal**, 2012 v. 57, n. 1, p. 58-64, mar. 2012.

DUAILIBE AS; GONÇALVES AG; AHID FJ. Effect of a propolis extract on Streptococcus mutans counts in vivo. **Journal of Applied Oral Science**, v.15, n.5, p.420-23. Oct. 2007.

DUQUE, C. et al. Clinical and microbiological performance of resin-modified glass ionomer liners after incomplete dentine caries removal. **Clinical of Oral Investigation**, v.13, n. 4, p. 465-71, dez. 2009.

ELSAKA SE; HAMOUDA IM; SWAIN MV. Titanium dioxide nanoparticles addition to a conventional glass-ionomer restorative: influence on physical and antibacterial properties. **Journal of Dentistry**, v. 39, n.9, p. 589-98. Sep. 2011.

FANG, M. et al. Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 6, p. 513-17, jun. 2006.

FARRET, M.M. et al. Can we add chlorhexidine into glass ionomer cements for band cementation? **The Angle Orthodontist**, v.81, n. 3, p.496-502, may. 2011.

FRIEDL, KH et al. Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on Streptococcus mutans growth. **European Journal of Oral Science**. v. 105, n.1, p. 81-5, feb. 1997.

FUSAYAMA T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. **Operative Dentistry**, n.4, v.2, p. 63-70. 1979.

GEURTSSEN W, SPAHL W, LEYHAUSEN G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. **Journal of Dental Research**, v. 77, n. 12, p. 2012-19. Dec. 1998.

HAMOUDA IM. Effects of various beverages on hardness, roughness, and solubility of esthetic restorative materials. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 23, n. 5, p. 315-22. Oct. 2011.

HATANAKA, G.R. et al. Effect of carbamide peroxide bleaching gel on composite resin flexural strength and microhardness. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 3, p. 263-66. 2013.

HATUNOĞLU, E. et al. Antibacterial and mechanical properties of propolis added to glass ionomer cement. **The Angle Orthodontist**, v. 84, n. 2, p. 368-73, mar. 2014

HENN, S. et al. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 22, n. 8, p.1797-802. Aug. 2011.

HENN, S. et al. Addition of zinc methacrylate in dental polymers: MMP-2 inhibition and ultimate tensile strength evaluation. **Clinical Oral Investigations**, n. 2, p. 531-6. Apr. 2012.

JAFARZADEH, K.T.S. et al. Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. v. 10, n. 2, p. 363-68. 2011.

JAFARZADEH, K.T.S. et al. Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 2, p. 363-68. 2011.

JEDRYCHOWSKI JR; CAPUTO AA; KERPER S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. **Journal of Oral Rehabilitation**, n.10, v.5, p.373-381, sep. 1983.

JONES, N. et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n.1, p. 71-76, feb. 2008.

KADOWAKI, S. et al. Development of new zinc dithiosemicarbazone complex for use as oral antidiabetic agent. **Biological Trace Element Research**, v. 154, n. 1, p. 111-19, Jul. 2013.

KORKMAZ FM et al. Antibacterial activity, surface roughness, flexural strength, and solubility of conventional luting cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 110, n. 2, p. 107-15, aug. 2013.

KUMAR S.V. Propolis in dentistry and oral cancer management. **North American Journal of Medical Science**, v. 6, n. 6, p. 250-59, Jun. 2014.

LI J; VON BEETZEN M; SUNDSTRÖM F. Strength and setting behavior of resin-modified glass ionomer cements. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 53, n. 5, p. 311-17, oct. 1995.

LIU, K. et al. Synthesis of TiO₂ nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. **Nanoscale**, v. 6, n. 15, aug. 2014.

LIU, K. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylazol-2-yl)-10,2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v.69, p. 581-592. 1997.

MALTZ, M. et al. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. **Quintessence International**, v. 33, n. 2, p. 151-59, feb. 2002.

MITRA Sumita B. **Photocurable ionomer cement systems**. EP 0323120 B1. dez. 1988. Disponível em: <http://www.google.com/patents/EP0323120B1?cl=en&hl=pt-BR> Acesso em: 20 jun. 2014.

MITRA Sumita B.; MITRA Smarajit. **Ethylenically-unsaturated moiety with acid-reactive filler, water-miscible acid polymer, photoinitiator, water-soluble oxidizing and reducing agentes; photocurable**. US 5154762, 31. maio. 1991. Disponível em: <https://www.google.com/patents/US5154762> Acesso em: 20 jun. 2014.

MOHAMMED N.R. et al. Physical chemical effects of zinc on in vitro enamel demineralization. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 9, p. 1096-104, Aug. 2014.

MOMOI Y. et al. Flexural properties of resin-modified "hybrid" glass-ionomers in comparison with conventional acid-base glass-ionomers. **Dental Materials Journal**, v. 14, n. 2, p.109-19, dez. 1995.

MONGKOLNAM P; TYAS MJ. Light-cured lining materials: a laboratory study. **Dental Materials**, v. 10, n. 3, p. 196-202, may. 1994.

NIU, L.N. et al. Tetrapod-like zinc oxide whisker enhancement of resin composite. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 7, p. 746-50, jul. 2010.

OGUSHI K; FUSAYAMA T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. **Journal of Dental Research**, v. 54, n. 5, p. 1019-26. sep./oct. 1975.

OSINAGA, P.W. et al. Zinc sulfate addition to glass-ionomer-based cements: influence on physical and antibacterial properties, zinc and fluoride release. **Dental Materials**, v. 19, n. 3, p. 212-17, may. 2003.

OZÓRIO, J.E. Standardized propolis extract and calcium hydroxide as pulpotomy agents in primary pig teeth. **Journal of Dentistry for Children**, v. 79, n. 2, p. 53-58. May-Aug. 2012.

PAROLIA, A. et al. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. **Australian Dental Journal**, v. 55, n.1, p. 59-64, mar. 2010.

ROGERO, S.O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.6, n.3, apr/jun. 2003.

ROSENBERG, L. et al. Observational: prospective study of indirect pulp treatment in primary molars using resin-modified glass ionomer and 2% chlorhexidine gluconate: a 12-month Follow-up. **Pediatric Dentistry**, v. 35, n. 1, p. 13-17, Jan./Feb. 2013.

SAINULABDEEN, S. Antibacterial activity of triclosan incorporated glass ionomer cements--an in vitro pilot study. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.35, n.2, p.157-61, 2010.

SCHNITZLER, P. et al. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytotherapy Research**, v. 24, n.1, p. 20-28, jan. 2010.

SILICI, S. et al. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. **Journal of Pharmacological Science**, v. 99, n. 1, p. 39-44, sep. 2005.

SPENCER, C.G. et al. Antimicrobial effects of zinc oxide in an orthodontic bonding agent. **The Angle Orthodontist**, v.79, n.2, p.317-222, mar. 2009.

STANISLAWSKI L. et al. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 48, n. 3, p. 277-88. 1999.

TEUGHELIS W. et al. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clinical of Oral Implants Research**, n. 2, p. 68-81, oct. 2006.

Tjäderhane, L. et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **Journal of Dental Research**, v. 77, n.8, p. 1622-29. Aug. 1998.

TOPCUOGLU, N. et al. In vitro antibacterial effects of glass-ionomer cement containing ethanolic extract of propolis on *Streptococcus mutans*. **European Journal of Dentistry**, v. 6, n.4, p. 428-33, oct. 2012.

TROCA, V.B. et al. Effect of green propolis addition to physical mechanical properties of glass ionomer cements. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 2, p. 100-05. Apr. 2011.

UNO S; FINGER WJ; FRITZ U. Long-term mechanical characteristics of resin-modified glass ionomer restorative materials. **Dental Materials**, v. 12, n. 1, p. 64-69. Jan. 1996.

WAGH V.D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Science**. ID 308249. Dec. 2013.

WILDE MG et al. Influence of 0.05% sodium fluoride solutions on microhardness of resin-modified glass ionomer cements. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v.17, n. 9, p.869-73, sep. 2006.

WILSON AD. Developments in glass-ionomer cements. **The International Journal of Prosthodontics**, v. 2, n. 5, p. 438-46, set./out. 1989.

WILSON AD; KENT BE. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. **British Dental Journal**, Londres, v. 132, n. 4, p.133-135, feb. 1972.

WILSON Alan D. Resin-modified glass-ionomer cements. **The International Journal of Prosthodontics**, v. 3, n. 5, p. 425-29, set./out. 1990.

XIE, D. et al. A novel comonomer-free light-cured glass-ionomer cement for reduced cytotoxicity and enhanced mechanical strength. **Dental Materials**, v. 23, n. 8, p. 994-1003, aug. 2007.

YESILYURT, C. et al. Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. **Operative Dentistry**, n.34, v. 1, p.18-23, jan/feb. 2009.

ZHANG H; SHAN Y; DONG L. A comparison of TiO₂ and ZnO nanoparticles as photosensitizers in photodynamic therapy for cancer. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 8, p.1450-57, Aug. 2014.



Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 23 de outubro de 2013

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0042/13
Intitulado: Inclusão de Antimicrobianos em Cimento de Ionômero de Vidro Modificado por Resina.
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima
Pesquisadores Associados: Patrícia Alves Scheid
Nível: Tese / Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 23 de outubro de 2013

Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes
Coordenadora da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS