

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM MATERIAIS DENTÁRIOS

MARIELE DINÁ MILDNER

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE DE COMPÓSITOS RESTAURADORES  
PARA TÉCNICA DIRETA E INDIRETA: ESTUDO *IN VITRO***

Porto Alegre  
2015

MARIELE DINÁ MILDNER

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE DE COMPÓSITOS RESTAURADORES  
PARA TÉCNICA DIRETA E INDIRETA: ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Materiais Dentários pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima

Porto Alegre  
2015

## Catálogo na Publicação

M641a Mildner, Mariele Diná  
Análise da citotoxicidade de compósitos restauradores para técnica direta e indireta: estudo in vitro / Mariele Diná Mildner. – Porto Alegre, 2015.  
44 f.

Diss. (Mestrado em Materiais Dentários) – Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.  
Orientador: Prof. Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima

1. Materiais Dentários. 2. Resinas Compostas. 3. Polimerizacao. 4. Odontologia. I. Oshima, Hugo Mitsuo Silva. II. Título.

CDD 617.695

Bibliotecária Responsável: Salete Maria Sartori, CRB 10/1363

*Dedico este trabalho aos meus pais, Laídes e Francisco, que sempre priorizaram o estudo e foram os grandes responsáveis pelo caminho que trilhei até agora.*

*“A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos  
mesmo quando todos dizem que ele é impossível.”*

*Cora Coralina*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima, pelos ensinamentos, oportunidade e disposição.

Aos professores da disciplina de Materiais Dentários da PUCRS, pelo imenso conhecimento transmitido.

Aos colegas do Mestrado/Doutorado, pela grande amizade construída.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

À CAPES, pela bolsa de estudos que oportunizou a realização deste curso.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, Prof. Ana Maria Spohr.

À Professora Maria Perpétua Freitas de Azevedo por toda a sua colaboração na execução desta pesquisa.

À Professora Denise Cantarelli Machado, do laboratório no Instituto de Pesquisas Biológicas do Hospital São Lucas da PUCRS.

Ao Biólogo Fagner Heldt, pela dedicação e ensinamentos na realização dos procedimentos laboratoriais.

A Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

## RESUMO

Um satisfatório grau de conversão do monômero é importante para melhorar a biocompatibilidade das resinas compostas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos métodos de polimerização adicional na citotoxicidade de diferentes compósitos restauradores. Para isso foram confeccionadas 18 amostras de cada uma das seguintes resinas testadas: Filtek Z350XT® (3M/ESPE, St Paul, MN, EUA), Sinfony (3M/ESPE, St Paul, MN, EUA), Lava Ultimate (3M/ESPE, St Paul, MN, EUA). A cor usada em todas as resinas foi a A2 de corpo. Para as resinas Filtek Z350XT e Sinfony utilizaram-se moldes de politetrafluoretileno de 3x2mm. Para a resina Lava Ultimate foram cortados do bloco cubos com 1,6mm de face usando um disco diamantado e paquímetro digital. As amostras foram divididas em 4 grupos: **Grupo FK**: Filtek Z350XT polimerizada por 20s com LED, **Grupo S**: Sinfony com polimerização adicional com luz e vácuo, **Grupo L**: Lava Ultimate, **Grupo FPA**: Filtek Z350XT com polimerização adicional com luz e vácuo. As espécies avaliadas estiveram em contato com meio DMEM por um período de incubação de 24, 48 e 72 horas respectivamente. Após, o meio de cultura foi colocado em contato com as células de fibroblastos NIH/3T3. Teste de MTT foi realizado para análise da viabilidade celular. Testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov ( $\alpha=0,05$ ) foram utilizados para análise estatística. O grupo S apresentou-se com a citotoxicidade mais baixa. Já a polimerização adicional no grupo FK não mostrou-se eficiente para a viabilidade celular. A resina Sinfony apresentou a menor citotoxicidade dentre os três materiais analisados. Uma polimerização adicional por luz e vácuo na resina Filtek Z350XT não melhora seu resultado para citotoxicidade quando comparado a polimerização direta da mesma.

**Palavras-chave:** Resina composta. Polimerização adicional. Citotoxicidade. Monômeros residuais. CAD/CAM.

## ABSTRACT

An appropriate monomer conversion of composite resins is very important to improve your biocompatibility. The aim of this study was to evaluate additional polymerization methods of dental resins cytotoxicity. A total of 72 samples were prepared from the following materials: Filtek Z350XT® (3M/ESPE, St Paul, MN, EUA), Sinfony (3M/ESPE, St Paul, MN, EUA), Lava Ultimate (3M/ESPE, St Paul, MN, EUA). The used color was A2 for all composite resins. To Filtek Z350XT and Sinfony a Teflon mould (3x2mm) was used. From Lava Ultimate block 1,6mm cubes was cutting with diamond discs and digital pachymeter. Samples was divided in 4 groups: **FK Group:** 20s LED polymerization, **S Group:** Sinfony with light and vacuum additional polymerization, **L Group:** Lava Ultimate, **FPA Group:** Filtek Z350XT with light and vacuum additional polymerization. Evaluate specimens was stored in DMEM medium for 24, 48 and 72 hours respectively. Thereafter, culture medium was in contact with NIH/3T3 fibroblasts. MTT test determined cellular viability. Statistical analysis realized by Levene and Kolmogorov-Smirnov tests ( $\alpha=0,05$ ). The S group show the lower cytotoxicity. Additional polymerization of FK group wasn't efficient to cellular viability. Sinfony presented minor cytotoxicity among all tested materials. Light and vacuum additional polymerization of Filtek Z350XT don't improve your cytotoxicity results when compared with direct polymerization of the same dental composite.

**Key Words:** Dental composite resins. Additional polymerization. Cytotoxicity. Monomer release. CAD/CAM.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Bloco de resina Lava

Figura2: Resina Filtek Z350

Figura 3: Resina Sinfony

Figura 4: Paquímetro digital e amostras Lava

Figura 5: Matriz de politetrafluoretileno para demais amostras

Figura 6: Preparo do meio de cultura

Figura 7: Placas contendo as amostras para extração do meio de cultura para análise

Figura 8: Placa após leitura com o resultado

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Características e composição das resinas

Tabela 2: Protocolo de polimerização

Tabela 3: Média dos valores de viabilidade celular

Gráfico 1: Valores médios com relação ao tempo de exposição celular

Gráfico 2: Valores médios de viabilidade celular para DMEM e hipoclorito

Gráfico 3: Média DMEM comparada às resinas na análise de 24h

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
Bis-GMA	bisfenol-A-dimetacrilato
CAD/CAM	computer-aided design/ computer-aided manufacturing
cm	centímetro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
et al.	et alli (e outros)
h	hora
ISO	Organização Internacional para Padronização
LED	Diodo emissor de luz
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetros
MTT	3-(4,5dimetil-2-tiazolil)2.5-difenil-2H-tetrazoliobrometo
N	newtons
n°	número
NaCl	Cloreto de sódio
NIH/3T3	linhagem de fibroblastos de camundongo
p	nível de significância
PBS	salina tamponada com fosfato
s	segundos
TEGDMA	trietilenoglicoldimetacrilato
U/mL	unidades por mililitro
UDMA	uretanodimetacrilato
UV	ultravioleta
V/cm <sup>2</sup>	volts por centímetro quadrado
X	vezes
µg	micrograma
µL	microlitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
%	por cento
°C	graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1 RESINAS COMPOSTAS .....	16
2.2 CITOTOXICIDADE.....	17
2.3 RESINAS COMPOSTAS PROCESSADAS EM LABORATÓRIO.....	22
2.4 POLIMERIZAÇÃO ADICIONAL .....	24
2.5 RESINAS COMPOSTAS CAD/CAM.....	26
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>30</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 MATERIAIS.....	31
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS LÍQUIDOS DOS MATERIAIS.....	34
4.3 LINHAGEM CELULAR, CONDIÇÕES DE CULTURA E DENSIDADE CELULAR.....	35
4.4 ANÁLISE DA REDUÇÃO DO MTT.....	35
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os materiais poliméricos são usados em muitas áreas na odontologia e na prótese dentária principalmente como material de cobertura estética<sup>1</sup>. Qualquer material restaurador deve ser biocompatível, ter potencial adesivo com a estrutura dental, possuir propriedades físicas e mecânicas similares aos tecidos dentais e serem quimicamente inertes. Atualmente na era da estética em odontologia, as resinas compostas são a classe de material que satisfazem muitos dos requisitos citados<sup>2</sup>. A biocompatibilidade é um importante pré-requisito para todos os bio-materiais e deve ser considerada, pois a resina composta pode afetar os tecidos que a cercam de duas maneiras: através da eluição de componentes bioativos e pelo aumento da temperatura durante a polimerização<sup>3</sup>. As resinas compostas foram usadas inicialmente para restaurar dentes anteriores. Mais tarde, foram introduzidas como material restaurador posterior. Porém, as restaurações diretas podem levar a um selamento inadequado, acarretando em microinfiltração, sensibilidade pós-operatória e recorrência de cárie<sup>4</sup>. As resinas compostas para técnica indireta vieram para atenuar a microinfiltração e otimizar as propriedades do material<sup>4</sup>.

A polimerização dos monômeros de matriz orgânica das resinas fotopolimerizáveis é desencadeada pela excitação de um sistema fotoiniciador pela luz<sup>5</sup>. Um dos problemas das resinas é a polimerização incompleta. O grau de conversão depende do comprimento de onda, distribuição do comprimento de onda e a intensidade da luz, bem como a distância da luz ao material, o tempo de polimerização, a composição, espessura e a cor do material<sup>6,7</sup>.

Um processo de polimerização eficiente pode prevenir, ou pelo menos limitar a lixiviação de componentes prejudiciais dos materiais restauradores. No caso das resinas baseadas em dimetacrilatos, são três espécies principais: monômeros de dimetacrilatos não-convertidos, radicais livres e moléculas fotoiniciadoras<sup>3</sup>. Polimerização insuficiente pode levar a uma grande porção de monômero residual ou separação de componentes da resina<sup>5</sup>. Estes monômeros liberados de restaurações de resina resultantes da polimerização incompleta interagem

com os tecidos orais<sup>8</sup>. Desse modo, propriedades físicas e químicas, bem como a performance clínica dependem de uma adequada polimerização dos monômeros resinosos<sup>8</sup>.

Os componentes mais comuns em todas as resinas são os monômeros/co-monômeros: bisfenol-A-dimetacrilato (Bis-GMA), trietilenoglicoldimetacrilato (TEGDMA) e uretanodimetacrilato (UDMA)<sup>9</sup>.

Monômeros como TEGDMA induzem citotoxicidade via apoptose em vários tipos de células, incluindo polpa e gengiva, e efeitos genotóxicos ou mutagênicos causados por monômeros também foi relatado<sup>8</sup>. UDMA e TEGDMA induziram citotoxicidade e danificaram o DNA, mas a combinação de ambos não produz um aumento deste efeito<sup>10</sup>. Os efeitos citotóxicos também dependem do tipo de resina<sup>11</sup> e da cor<sup>12</sup>.

Diversos estudos verificaram que o tipo de luz usada para polimerização da resina também tem grande influência na citotoxicidade. Materiais polimerizados com LED apresentaram maior sobrevivência celular<sup>13</sup>, enquanto a luz halógena acarreta maior liberação de monômero<sup>14</sup>. A fonte de luz usada também mostrou-se relevante nos efeitos de toxicidade<sup>5,12</sup>.

Assim, é necessário modificar os materiais e otimizar as condições de polimerização para reduzir a quantidade de componentes lixiviados<sup>3</sup>.

As resinas compostas processadas em laboratório são uma alternativa clínica para superar algumas deficiências inerentes às restaurações de resina composta direta, o que inclui contração de polimerização, polimerização inadequada nas áreas interproximais profundas e restauração do contorno e contato proximal<sup>16</sup>.

Para estas resinas indiretas, uma polimerização adicional ou secundária é feita extra oralmente, o que aumenta o grau de conversão e reduz os efeitos de contração de polimerização. A única contração inevitável é a do cimento<sup>4</sup>. Existem diferentes técnicas de processamento laboratoriais, baseados na combinação de calor, pressão, vácuo e polimerização por luz<sup>15</sup>. Este segundo ciclo de polimerização pode aumentar significativamente o grau de conversão da resina e aumenta a mobilidade molecular do monômero residual e da cadeia de segmentos após a polimerização inicial<sup>15</sup>.

Restaurações dentais fresadas pelo uso de tecnologia CAD/CAM são úteis para restaurações de longa duração e alta qualidade<sup>17</sup>. O desenho e manufatura da restauração pode ser feito tanto no laboratório dental ou diretamente no consultório, com a vantagem do tempo de tratamento reduzido e eliminação de procedimentos de restauração temporária<sup>18</sup>.

Restaurações CAD/CAM são uma alternativa previsível com alta taxa de sucesso, estabilidade de cor, excelente adaptação marginal e função clinicamente aceitável<sup>19</sup>. Os blocos destas resinas são polimerizados em altas temperaturas e pressão sob condições controladas, resultando em propriedades químicas e mecânicas consistentes e resistência flexural maior que blocos polimerizados manualmente<sup>20</sup>.

Desta forma, faz-se importante saber se a polimerização adicional é relevante no que diz respeito à citotoxicidade dos compósitos restauradores.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – RESINAS COMPOSTAS

Compostos de metacrilato são amplamente usados na forma polimérica na odontologia estética e restauradora<sup>21</sup>. As técnicas adesivas têm uma ampla variedade de aplicações na odontologia, incluindo procedimentos restauradores, prótese, ortodontia e odontologia preventiva, fazendo das resinas compostas um dos grupos de materiais mais importantes<sup>22</sup>.

Resinas compostas são uma mistura de uma rede de resina polimerizada reforçada por carga inorgânica. O polímero é formado pela polimerização dos monômeros de metacrilato<sup>23</sup>.

As resinas são compostas por uma mistura de uma matriz orgânica polimerizável, partículas de carga reforçando o preenchimento, moléculas promotoras e modificadoras da reação de polimerização, e silano como agente de união entre a carga e matriz orgânica. A carga é inorgânica na natureza, formada por quartzo, borossilicato, vidro de lítio-alumínio-silicato e sílica amorfa. A matriz orgânica consiste em uma mistura de vários monômeros de metacrilato, como Bis-GMA e UDMA em combinação com co-monômeros de baixa viscosidade como TEGDMA, EGDMA ou DEGMDMA<sup>22, 24, 25</sup>.

Bis-GMA é um monômero frequentemente utilizado nas resinas compostas. É um oligômero dimetacrilato de alto peso molecular ( $M = 512 \text{ g/mol}$ ), que possui alta viscosidade, o que torna este monômero menos apropriado para compósitos dentais. A adição de partículas de carga inorgânica resulta em pastas muito duras, cujas propriedades de manuseio não são aceitáveis na prática odontológica. Assim, o Bis-GMA é diluído em um metacrilato de baixa viscosidade e baixo peso molecular. O diluente mais comum é o TEGDMA. A adição deste metacrilato ao Bis-GMA causa maior contração com a mesma conversão, pois a concentração de grupos de metacrilatos na resina não polimerizada é maior<sup>26</sup>.

## 2.2 – CITOTOXICIDADE

As pesquisas iniciais focaram primeiramente na melhoria da estrutura física e função mecânica dos materiais resinosos, visando melhorar seu manuseio. Questões que abordavam a sua segurança biológica foram levantadas mais tarde<sup>27</sup>.

Apesar de as resinas compostas serem consideradas bem toleradas biologicamente, há relatos na literatura de efeitos alérgicos como eczema, asma ou reações liquenóides devido à dissolução do metacrilato. Adicionalmente, estudos identificaram o metacrilato como causa da inflamação pulpar<sup>25</sup>. Uma vez que os materiais restauradores estiverem em contato direto com gengiva, dentina, periodonto, mucosa oral e fluidos corporais, a lixiviação de componentes destes materiais no ambiente oral é uma preocupação clínica<sup>28</sup>.

É sabido que o grau de conversão das resinas fotopolimerizadas é de 55% a 80%. Este grau de conversão também depende do tipo, intensidade e duração da unidade de luz e de algumas propriedades do sistema resinoso, bem como da espessura da resina<sup>29</sup>. Karaarslan, Altintas, Bulbul, Cebe e Usumezet (2011) avaliaram a dissolução in vitro dos monômeros Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, Bis-DMA e Bis-EMA das resinas compostas durante dois períodos de tempo diferentes e sob diferentes métodos de polimerização através de cromatografia líquida de alta performance. Foram usadas as resinas Filtek e P60 em amostras de 5mm de diâmetro e 2mm de altura. Estas resinas foram polimerizadas de ambos os lados por 30s com luz halógena ou 20s com LED. Os grupos 1 e 2 receberam apenas essa polimerização. Grupos 3 e 4 foram submetidos a uma pós-cura sob calor e pressão em autoclave, e o grupo 5 foi polimerizado em um forno de onlay. A menor quantidade de monômero liberado foi encontrada nas amostras polimerizadas no forno de onlay, e os valores mais altos nas amostras polimerizadas por LED e submetidas à autoclave. Quanto aos monômeros, o que teve uma maior quantidade liberada foi TEGDMA, e o Bis-EMA apresentou os menores valores. A liberação de componentes, como monômeros residuais, oligômeros e produtos da degradação das resinas compostas podem influenciar na biocompatibilidade das restaurações.

A biocompatibilidade de um material restaurador resinoso é predominantemente determinada pela quantidade e natureza das substâncias orgânicas

liberadas<sup>30,31</sup>. A citotoxicidade é também dependente da permeabilidade dentinária e espessura de dentina residual<sup>32</sup>. Microcanais presentes na dentina constituem a rota de migração dos monômeros para a polpa<sup>22,23</sup>. Assim, a citotoxicidade está relacionada com o tipo e quantidade de componentes liberados<sup>28</sup>.

Sevkusic *et al* (2014) definiu produto da dissolução como substâncias que são liberadas ou lavadas das resinas compostas, e produtos da degradação substâncias formadas durante o processo de dissolução com o diluente. Em sua análise, após 180 dias todas as substâncias liberadas das resinas compostas foram identificadas como produtos da dissolução.

Está estabelecido que o tipo e quantidade de componentes liberados das resinas depende de vários fatores, incluindo o meio de diluição (aquoso ou solventes orgânicos), estrutura química dos compósitos, a solubilidade e peso molecular dos monômeros e o grau de conversão da matriz orgânica<sup>31,33</sup>. Monômeros e comonômeros podem ser liberados durante a inserção e mesmo após a polimerização<sup>9</sup>. Yildirin-Bicer, Ergun, Egilmez e Demirkoprulu (2013) compararam os efeitos da citotoxicidade em duas resinas para uso indireto, Artglass e Solidex. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes e divididas em dois grupos. No primeiro grupo as amostras foram transferidas para um meio de cultura por 1 hora, 24 horas, 72 horas, 1 semana e 2 semanas. O segundo grupo foi transferido para um meio de cultura por 1 hora, 24 horas, 72 horas, 1 semana e 2 semanas após ficarem armazenados por 48 horas em saliva artificial. O meio foi pipetado para avaliação em uma cultura celular de fibroblastos de camundongo L-929 e incubado por 24 horas. A mensuração foi feita através de MTT. Ambos os grupos apresentaram menor viabilidade celular em todos os tempos quando comparados ao grupo controle. Armazenagem em saliva artificial reduziu a citotoxicidade significativamente, porém estes efeitos ainda estavam presentes após 48 horas de armazenagem. Assim, monômeros não-aderidos e/ou aditivos são diluídos por solventes ou degradação do polímero dentro das primeiras horas após a polimerização inicial.

Entre os monômeros liberados dos materiais resinosos, o TEGDMA tem tido a sua toxicidade estudada por ser o mais facilmente liberado das resinas polimerizadas em meio aquoso<sup>33</sup>. Em geral, a citotoxicidade dos monômeros

resinosos mais importantes pode ser classificada na seguinte ordem decrescente: Bis-GMA, UDMA, TEGDMA e MMA<sup>24,34,35</sup>. UDMA e TEGDMA podem exercer toxicidade significativa e podem interagir entre si, produzindo efeitos diferentes daqueles esperados quando os mesmos agem sozinhos<sup>10</sup>.

Anand e Balasubramanian (2014) observaram o efeito da composição da resina composta na profundidade de polimerização e citotoxicidade destes materiais. Para esta análise comparativa, foi usada a Ceram X (ormocer) e Filtek P90 (silorano). As amostras foram preparadas em discos de 2mm de espessura e 4mm de diâmetro. As amostras para citotoxicidade foram polimerizadas por 5s, 10s, 20s e 40s com luz halógena. As amostras foram então cortadas em um micrótomo em fatias de 60µm de espessura e 6 mm de diâmetro para cada material para análise do grau de conversão. A viabilidade celular foi medida pela técnica corante azul Trypan em 24h e 48h. Ambas resinas mostraram um progressivo aumento na reatividade a medida que as distâncias de polimerização aumentaram. O grau de conversão da Filtek P90 foi de 20% em 5s e 96% em 40s. Ceram X obteve 33% em 5s e 50% em 40s. Assim, o grau de conversão de uma resina baseada em silorano é significativamente maior no tempo de polimerização recomendado. Todos os monômeros exibem um efeito citotóxico dose-dependente.

Em seu trabalho, Chang *et al* (2009) observaram, através da análise de MTT, que o Bis-GMA induz citotoxicidade em células pulpares humanas em concentrações maiores que 0,075mM. 1mM de Bis-GMA também estimula fosforilação de ERK, produção de prostaglandina PGE<sub>2</sub>, expressão de COX-2 mRNA e produção de oxigênio reativo, levando a mudanças morfológicas.

O processo de polimerização que ocorre *in situ* é sempre incompleto, resultando na presença de monômeros de metacrilato na cavidade oral e no dente. Estes podem migrar pelos microcanais da dentina e entrar na cavidade pulpar. Dessa forma, ganham acesso ao sistema vascular e estes monômeros podem estar potencialmente presentes em todos os tecidos e órgãos após serem transportados pela corrente sanguínea<sup>21</sup>. Além disso, há um estresse mecânico associado à mastigação e à ação enzimática da saliva. As concentrações de TEGDMA que chegam à polpa são suficientemente altas para induzir um amplo espectro de efeitos nocivos nas células pulpares e outros tecidos, que podem

ser atingidos pelos metacrilatos pela corrente sanguínea<sup>21</sup>. Também pode-se chegar ao sistema circulatório via sistema intestinal, através da saliva deglutida<sup>25</sup>.

Clinicamente, a liberação de monômeros ocorre durante a degradação da resina por oxidação e enzimas hidrolíticas na saliva e tecido pulpar, ou por reação com químicos exógenos como ácidos, bases, sal, álcoois e oxigênio. Estima-se que 8-10% dos monômeros não reagidos nas resinas são dissolvidos, e a dissolução se completa em 1-3 dias<sup>36</sup>. Uma média muito mais alta de monômeros dissolvidos é encontrada em resinas não adequadamente fotopolimerizadas.

As variáveis que influenciam o grau de polimerização são a cor da resina, energia luminosa liberada durante a cura e distância entre a unidade de luz e a superfície da amostra. Além disso, durante a polimerização novos produtos da reação surgem e podem ter potencial tóxico/alérgico<sup>25</sup>.

Diferentes resinas compostas mostram sinais de citotoxicidade, embora em vários graus, provavelmente dependendo do percentual e quantidade dos ingredientes destas resinas<sup>24</sup>. Tem sido relatado que os monômeros induzem a um amplo espectro de resultados biológicos adversos, incluindo efeitos citotóxicos e genotóxicos<sup>21</sup>.

Estudos de cultura celular são frequentemente utilizados para avaliar a citotoxicidade de materiais a base de resina, sua dissolução e componentes<sup>31,33</sup>. A citotoxicidade dos monômeros das resinas tem sido avaliada com linhagem celular permanente de cultura primária de fibroblastos de várias origens como polpa, gengiva e ligamento periodontal<sup>34</sup>. A escolha por fibroblastos para testes de citotoxicidade é relatada pelo fato de que este tipo celular é o mais comum na polpa, que é o alvo dos componentes químicos liberados dos compósitos<sup>24</sup>. Além do mais, são tipos celulares aprovados pela ISO<sup>24, 28</sup>.

Há uma variedade de testes *in vitro* para o exame de citotoxicidade dos biomateriais. Eles incluem: 'testes de contato direto', onde o biomaterial contata o sistema celular diretamente sem barreiras, 'teste de contato indireto', onde há uma barreira entre o biomaterial e o sistema celular, e 'testes de extrato', pelo qual eluentes dos biomateriais são expostos às células<sup>37</sup>. Determinar a viabilidade celular através do método MTT é rápido, fácil de executar e permite

que um grande número de amostras seja analisado em uma remessa<sup>28</sup>. Contudo, como não se sabe a quantidade de componentes que são liberados pelas resinas *in vivo* e em que medida elas são diluídas, inativadas e ainda capazes de induzir respostas biológicas, deve-se ter cuidado com a interpretação dos resultados<sup>33</sup>.

Os efeitos citotóxicos das resinas compostas podem depender de seus constituintes, particularmente de sua matriz orgânica. Em contrapartida, o componente inorgânico aparentemente não está envolvido no mecanismo de citotoxicidade, como afirma Ausiello *et al* (2011). Em seu estudo, foram avaliadas resinas compostas contendo Bis-GMA em sua composição (Clearfil Majesty Posterior - Kuraray) e não contendo Bis-GMA (Clearfil Majesty Flow - Kuraray) e uma resina autopolimerizável (Clearfil DC Core Automix - Kuraray). As resinas foram fotopolimerizadas e colocadas diretamente em contato com células de fibroblastos NIH-3T3 por 24, 48, 72 e 96h. A citotoxicidade foi avaliada pela mensuração de morte celular através de citometria, proliferação celular através da análise de curvas de proliferação e mudanças morfológicas através de análise microscópica óptica. Todos os materiais analisados causaram diminuição na proliferação celular, embora em diferentes graus. Contudo, apenas Clearfil DC Core Automix induziu morte celular, muito provavelmente por aumentar a apoptose. A mesma resina também causou as maiores alterações morfológicas. Por esta razão, um número de estudos foca na toxicidade de cada componente orgânico presente na resina dental. Contudo, além dos efeitos isolados, a interação entre eles também deve ser avaliada.

Em termos de genotoxicidade, TEGDMA e Bis-GMA tem aumentado o número de micronúclei em concentrações subtóxicas e promovem a degradação do DNA derivados do tecido glandular salivar e linfócitos, como mostrado em ensaios<sup>33</sup>. Efeitos genotóxicos do Bis-GMA, TEGDMA e UDMA também têm sido demonstrados usando o *DNA SSB (single strand break)* em linfócitos humanos e células do tecido glandular salivar humano<sup>9</sup>. Apoptose, bem como mutagenicidade causados pelos monômeros das resinas também podem ser medidos por estresse oxidativo<sup>34</sup>.

Os efeitos genotóxicos não estão associados com mudanças sérias na viabilidade celular, mas estão ligados à apoptose e mudanças no ciclo celular.

Além disso, monômeros de metacrilato podem ter potencial para induzir efeitos genotóxicos que resultam em mudanças fenotípicas<sup>21</sup>. Estudos dos mecanismos desses efeitos podem ajudar a prevenir ou diminuir suas consequências.

Casos de genotoxicidade sem citotoxicidade podem ser encontrados em várias concentrações para todos os monômeros resinosos<sup>35</sup>.

### 2.3 – RESINAS COMPOSTAS PROCESSADAS EM LABORATÓRIO

Sistemas de resina composta processadas em laboratório para restaurações intracoronárias em dentes posteriores têm aumentado com a melhora nas propriedades físicas e mecânicas destes sistemas, bem como a demanda dos pacientes por restaurações estéticas<sup>29</sup>. Elas apresentam-se como um meio alternativo aos clínicos para superar as deficiências inerentes às resinas compostas diretas, incluindo contração de polimerização, polimerização inadequada nas áreas profundas interproximais e restauração do contato e contorno proximal<sup>15</sup>. Estas resinas são processadas por diferentes técnicas laboratoriais baseadas na polimerização pela combinação de calor, pressão, vácuo e luz<sup>15</sup>, e diferem das resinas diretas por apresentarem um maior grau de conversão e uma polimerização mais homogênea<sup>38</sup>.

Restaurações de resina composta confeccionadas usando a técnica indireta resultam em menor contração de polimerização, reduzem o estresse entre o dente e o cimento resinoso, evitam sensibilidade pós-operatória, com menor sorção de água e, portanto, descoloração. Também é necessário um menor tempo de finalização e polimento na cadeira<sup>39</sup>. Possuem resistência similar ao esmalte dental e compatibilidade com o antagonista em dentição natural<sup>40</sup>. Dependendo da combinação de polimerização usada, obtém-se um aumento de 10% a 20% nas propriedades mecânicas destes materiais quando comparados às resinas compostas diretas<sup>39</sup>.

Em seu trabalho de 2010, Souza *et al* avaliaram o grau de conversão de quatro resinas compostas indiretas de diferentes composições e processadas em unidades de polimerização diferentes. Foram preparadas amostras dos materiais Resilab (Wilcos), Sinfony (3M ESPE), Vita VMLC (Vita) e Vita Zeta (Vita) nas dimensões 25 x 2 x 2mm<sup>3</sup> para o teste de resistência flexural, 5 x 4mm<sup>2</sup> para o

teste de microdureza Vicker's e para o grau de conversão usou-se Espectroscópio FT-Raman. Havia 10 amostras em cada grupo. Para os testes de resistência flexural e microdureza, a metade das amostras foram armazenadas em água destilada a 37°C por 24 horas e a outra metade foi submetida a termociclagem (5000 ciclos, 30s por ciclo). Resistência flexural foi mensurada em uma máquina de testes universal. Microdureza foi realizada a 50g. Como resultado, a termociclagem diminui significativamente a resistência flexural de três resinas testadas, com exceção da Vita Zeta quando comparada aos grupos sem termociclagem. Os resultados de microdureza mostraram que apenas a Sinfony é afetada pela termociclagem. Os valores do grau de conversão variaram entre 63% e 81% e não houve diferença estatisticamente significativa entre as resinas testadas. Como conclusão, o grau de ligações cruzadas verificadas pela espectroscopia FT-Raman não corresponde aos resultados do comportamento mecânico dos materiais testados. Embora a microdureza da Sinfony tenha sido afetada pela termociclagem, 5000 ciclos não diminui a microdureza da maioria das resinas indiretas. Em contrapartida, a termociclagem diminui a resistência flexural da maioria das resinas analisadas, com exceção da Vita Zeta.

Há alguns anos, uma nova geração de resinas indiretas foi desenvolvida chamada cerômeros (polímeros otimizados por cerâmica), com uma maior densidade de partículas inorgânicas em comparação com compósitos tradicionais<sup>38</sup>. Em seu estudo, Santos, Souza, Guedes, Pavan (2012) avaliaram o efeito da pós-polimerização na estabilidade de cor das resinas compostas. Para isso, confeccionou amostras de 1,2mm de espessura e 1,5mm de diâmetro das resinas Sinfony (3M-ESPE), que possui 50% de carga inorgânica, e Filtek Z250 (3M-ESPE) com 84,5% de carga inorgânica. A resina Filtek Z250, com indicação de uso direto, e Sinfony, para uso com a técnica indireta foram polimerizadas com LED por 20s; em outro grupo ambas resinas foram polimerizadas por 5s com luz (Visio Alfa) e pós-polimerizadas com luz e vácuo por 15 minutos (Visio Beta). Todas as amostras foram submetidas a uma análise cromática inicial usando um espectrômetro de reflexão UV, e então submetidas a um processo de envelhecimento artificial UV. Este envelhecimento acelerado simula condições ambientais extremas. A estabilidade de cor foi determinada



pela diferença entre as coordenadas obtidas pelas amostras antes e depois do processo de envelhecimento. A Filtek Z250 apresentou a menor mudança de cor em comparação com a Sinfony tanto quando fotopolimerizadas como quando pós-polimerizadas. Assim, resinas compostas com baixo conteúdo de partículas inorgânicas apresentam pobre estabilidade de cor.

#### 2.4 – POLIMERIZAÇÃO ADICIONAL

Um alto grau de conversão do metacrilato nas resinas dentárias é importante para obter-se boas propriedades mecânicas e para uma melhor biocompatibilidade<sup>26</sup>.

A canforoquinona é o fotoiniciador mais comumente utilizado em resinas compostas, e embora presente em pequenas quantidades, influencia significativamente na coloração do material<sup>41</sup>. Uma polimerização insuficiente pode não converter completamente a canforoquinona<sup>38</sup>.

A polimerização sob alta pressão é uma estratégia interessante para tentar melhorar as propriedades dos polímeros<sup>42</sup>. Muitas destas propriedades aumentam pelo aquecimento pós-cura, como resistência à fratura, módulo flexural e resistência flexural<sup>29</sup>. Os vários métodos de pós-polimerização (luz, calor, pressão, vácuo e nitrogênio) conferem à segunda cura da resina um aumento na conversão do monômero para polímero no material resinoso<sup>29</sup>. A diferença na distância entre a unidade de luz manual e laboratorial pode afetar a profundidade de polimerização<sup>38</sup>. Polimerização sob alta temperatura e pressão causam grande redução na liberação de monômeros residuais nos polímeros com UDMA<sup>42</sup>.

Phan, Tang, Nguyen, Ruse e Sadoun (2014) procuraram determinar as propriedades mecânicas e físicas e liberação de monômero na utilização de alta pressão e alta temperatura para polimerização do UDMA. Polímeros de UDMA foram confeccionados em moldes de 2 x 4 x 20mm. O primeiro grupo foi fotopolimerizado com LED por 20s, o segundo termopolimerizado a 90°C a 0,1Mpa por 4h, o terceiro grupo polimerizado sob alta pressão a 90°C e 300Mpa por 4 h, quarto grupo polimerizado sob alta temperatura e alta pressão a 190°C e 300Mpa por 1 h, e no quinto grupo não foi utilizado um iniciador e a

polimerização se deu a 190°C e 330Mpa por 1 h. Foram analisadas resistência flexural, dureza, resistência à fratura e densidade. Cromatografia líquida de alta performance foi utilizada para analisar a liberação de monômero. Os resultados mostraram que a polimerização sob alta pressão e alta temperatura resulta em um significativo aumento da resistência flexural e densidade. Não houve diferença significativa em dureza e resistência à fratura entre os materiais quando polimerizados sob alta temperatura e alta pressão. Nos grupos polimerizados sob alta temperatura e alta pressão houve significativamente menor liberação de monômero. Assim, polimerização sob alta pressão e alta temperatura pode afetar a rede de estrutura dos polímeros de UDMA com uma melhora das propriedades físicas e mecânicas e grande redução na liberação de monômero. Uma menor porosidade superficial também pode ser conseguida através da polimerização sob vácuo<sup>15</sup>.

Diversos estudos têm mostrado que quando as resinas são pós-polimerizadas adicionalmente sob diferentes condições laboratoriais, um grau de conversão superior a 80% pode ser alcançado<sup>15,33</sup>. Bakopoulou, Tsiftoglou, Galaktidou, Markala, Trivaii e Garefis (2007) avaliaram os efeitos da elução de resinas compostas diretas e indiretas. Foram utilizadas duas resinas compostas híbridas (Tetric Ceram: Ivoclar-Vivadent e Filtek Z250: 3M-ESPE), uma resina nano-híbrida (Simile: Pentron) e duas resinas compostas para restaurações indiretas (Adoro: Ivoclar-Vivadent e Conquest Sculpture: Pentron). Todas as amostras tinham 5mm de diâmetro e 2mm de espessura. As três resinas de uso direto foram fotopolimerizadas por 40s de um lado com LED. Adoro e Sculpture foram pré-polimerizadas por 20s com o mesmo LED e depois pós polimerizadas em laboratório de acordo com as instruções dos fabricantes. As amostras não foram cobertas com filme de poliéster. Estas amostras foram então imersas em meio de cultura por 24, 48 ou 72 horas a 37°C. Para a cultura celular foram utilizados fibroblastos WEHI 13. Para mensuração da citotoxicidade foi utilizado MTT para morte celular. O perfil do ciclo celular foi analisado por citometria e imunológica e alterações morfológicas por microscopia fluorescente com acridini laranja. Todos os meios começaram a causar toxicidade celular após 24-48h. A citotoxicidade foi maior nas células em meio com Filtek Z250, e menor com Sculpture e Adoro. A solubilização em 24h foi a menos tóxica e em 72h a mais

tóxica. Após 72h as três resinas diretas foram significativamente mais citotóxicas que as indiretas. Os materiais indiretos foram ligeiramente mais citotóxicos nas primeiras 48h e recuperaram a atividade metabólica celular após 72h em cultura. As resinas diretas também causaram as maiores alterações na morfologia celular. Este segundo ciclo de polimerização aumenta o grau de conversão por aumentar a mobilidade molecular do monômero residual e da cadeia de segmentos após a polimerização inicial<sup>33</sup>. Sob estas condições, aparentemente uma menor quantidade de monômeros residuais não reagidos podem ser potencialmente lixiviados para a cavidade oral e exercer um efeito adverso.

## 2.5 – RESINAS COMPOSTAS CAD/CAM

A tecnologia CAD/CAM permite a fresagem de diferentes materiais para aplicação odontológica. Como alternativa às cerâmicas, polímeros CAD/CAM têm sido recentemente introduzidos para restaurações dentais, que podem ser processados rapidamente e com menor custo<sup>20</sup>.

Resinas poliméricas CAD/CAM podem ser consideradas para restaurações de longo prazo no lugar de cerâmicas vítreas para alguns pacientes. Elas apresentam uma estabilidade de cor similar às cerâmicas<sup>43</sup>. Suas propriedades mecânicas como resistência flexural, são comparáveis às cerâmicas vítreas, mas os valores de dureza das cerâmicas são maiores. Uma vantagem de todos os materiais resinosos é sua deformação plástica, que pode prevenir a fratura espontânea da restauração<sup>20</sup>.

Stawarczyk, Krawczuk e Ilie (2013) testaram e comparou blocos de resina CAD/CAM de dois corpos. Para isso, analisou amostras feitas de 5 resinas CAD/CAM (Zeno PMMA, artBlock Temp, Telio CAD, Blank High-class, CAD-Temp), uma resina polimerizada manualmente (Integral Estetic Press) e uma cerâmica vítrea (VITA Mark II). As resinas e cerâmica CAD/CAM foram cortadas em uma espessura de 2mm e depois incluídas no centro de um cilindro de aço inoxidável de 15mm de diâmetro com resina acrílica. A resina polimerizada manualmente foi inserida diretamente em um molde de aço inoxidável e polimerizada de acordo com a instrução do fabricante. As amostras foram envelhecidas em uma máquina de carga termomecânica. O simulador,

controlado através de computador, exercia uma carga oclusal máxima de 49N a 1,67Hz. Estresses térmicos variavam de 5°C a 50°C a cada 120s. As cúspides mesiovestibulares de molares superiores humanos fixados em amálgama foram usadas como antagonistas. A perda vertical de material de todas as amostras foi mensurada antes, durante e após o envelhecimento através de um perfilômetro 3D. Adicionalmente, as amostras foram analisadas com um microscópio eletrônico de varredura após os testes. A resina polimerizada manualmente mostrou significativamente maior perda de material do que os outros grupos testados. A cerâmica vítrea mostrou os menores valores de desgaste das amostras, mas maior desgaste no esmalte. Não houve diferença significativa no desgaste do esmalte entre as resinas testadas. O grupo da cerâmica vítrea mostrou dano em forma de trinca na superfície do esmalte em 50% das amostras. Desse modo, as resinas CAD/CAM mostraram menores médias de desgaste pelo uso do que a resina polimerizada convencionalmente. Apenas uma resina (Telio CAD) apresentou valores de desgaste comparável à cerâmica vítrea. A cerâmica vítrea testada desenvolveu trincas no esmalte antagonista e mostrou maiores valores de desgaste pelo uso de todos os grupos testados.

Resinas compostas CAD/CAM que são comercializadas como “classificadas como cerâmica” podem mostrar menor propagação de fraturas sob forças de fadiga do que algumas cerâmicas CAD/CAM<sup>44</sup>. Também podem prover melhor resistência à fratura para restaurações oclusais não retentivas em dentes posteriores que algumas cerâmicas CAD/CAM<sup>45</sup>. Por serem um material menos frágil, podem ser usadas em camadas finas, permitindo preparos mais conservadores e restaurações mais resistentes<sup>19</sup>.

Batalha-Silva, Andrada, Maia e Magne (2013) avaliaram a influência da seleção da técnica e do material em restaurações adesivas grandes ocluso-mésio-distais (MOD) e seu efeito na propensão à fratura e resistência à fadiga acelerada *in vitro*. Para isso, um preparo MOD standardizado foi executado em 32 molares superiores extraídos (5mm de profundidade e 5 mm de largura vestibulo-palatal). 15 dentes foram restaurados com resina composta direta (Miris2- Còltene) em incrementos de 1,5mm polimerizados por 20S; e 17 dentes receberam inlays fresadas usando blocos de Paradigm MZ100 (3M-ESPE – tamanho 14) na máquina Cerec 3 (Sirona). Todas as inlays foram condicionadas com jateamento

de óxido de alumínio e ácido fosfórico a 35%, e cimentadas adesivamente com uma resina composta fotopolimerizada (Filtek Z100 – 3M-ESPE) pré-aquecida a 68°C por 5 minutos. As amostras restauradas foram mantidas em água destilada em temperatura ambiente por uma semana. Cada superfície dentária foi então submetida ao mapeamento da fenda do esmalte (transluminescência e fotografia). Uma boca artificial (Mini Bionix II) foi usada para simular as forças mastigatórias com um antagonista com uma esfera de resina composta (Filtek Z100 – 3M-ESPE) de 7mm de diâmetro pós-polimerizada a 100°C por 5 min. A esfera de resina composta contactava simultaneamente e igualmente as cúspides mesiovestibular, distovestibular e lingual em uma mastigação isométrica de 5HZ de frequência. As amostras foram submetidas à carga até a fratura ou até um máximo de 185000 ciclos, e o número de ciclos suportados foi registrado. Sob um microscópio óptico e com a concordância de dois examinadores, foi feita a distinção entre fratura restaurável e não restaurável. Uma fratura restaurável normalmente está acima da junção amelo-cementária, exceto em caso de perda da maior parte da porção coronária. As amostras foram avaliadas múltiplas vezes durante o experimento para detectar novas fraturas no esmalte em magnificação estandardizada de 1,5x e com transluminação, antes e depois do preparo dental, uma semana após a restauração e no fim do teste de fadiga. A sobrevivência no grupo MZ100 foi de 100%. A sobrevivência do grupo M2 foi 13%, sendo que a maioria das falhas ocorreram entre 1200 e 1400 ciclos. Porém, para este grupo, 67% das fraturas foram consideradas restauráveis. Após a restauração e uma semana de armazenamento em água destilada, a propensão à fratura foi maior no grupo M2 (47%) do que no grupo MZ100. Após os testes de fadiga, não foram encontradas novas trincas horizontais, mas múltiplas trincas verticais no esmalte na maioria das amostras. Restaurações inlays com resina CAD/CAM MZ100 aumentam a resistência à fadiga e diminuem a propensão a trincas e fraturas em restaurações grandes MOD, quando comparadas a restaurações de resina direta. Ambas técnicas restauradoras produziram excelentes resultados a cargas mastigatórias fisiológicas, mas inlays CAD/CAM parecem ser mais indicadas para pacientes com grande carga oclusal.

Baseado na polimerização industrial estandardizada dos blocos de resina CAD/CAM sob alta pressão e temperatura, podem ser encontradas propriedades

físicas e mecânicas significativamente maiores quando comparadas com a polimerização convencional (direta e indireta) dos materiais resinosos. Ela não apenas melhora o comportamento mecânico, mas há também menos descoloração e maior resistência à abrasão em relação às resinas polimerizadas de forma convencional. Além do mais, o operador tem um efeito considerável na qualidade das resinas polimerizadas convencionalmente<sup>18</sup>.

### **3 . OBJETIVO**

Avaliar o efeito do método de polimerização na citotoxicidade de diferentes compósitos restauradores.

Comparar compósitos polimerizados por diferentes métodos e sua relação com a melhora da citotoxicidade.

## 4 . MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS, sob o protocolo 0027/14.

### 4.1 Materiais

Três diferentes resinas foram testadas neste estudo: Filtek Z350XT® (3M/ESPE, St Paul, MN, EUA), Sinfony (3M/ESPE, St Paul, MN, EUA), Lava Ultimate (3M/ESPE, St Paul, MN, EUA). A cor usada em todas as resinas foi a A2 de corpo.

Tabela 1: Características e composição das resinas

<b>Material</b>	<b>Matriz</b>	<b>Partículas de carga</b>	<b>Classificação</b>
Filtek Z350XT®	Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, Bis-EMA	Partículas não agregadas de sílica (20 nm), partículas não agregadas de zircônia (4-11nm) e agregados formados por partículas de zircônia/sílica (20 nm). Carga de 78,5% em peso	Nanoparticulada
Sinfony	UDMA	Vidro boro-silicato de Sr e Al (0,5-0,7µm), 5% ionômero de vidro, 5% sílica pirogênica (0,06µm). Carga de 40% em peso	Híbrida
Lava Ultimate	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA e Bis-EMA	Partículas de sílica (20nm) e zircônia (4-11nm). Carga de 80% em peso	Nanocerâmica





Figura 1: Bloco de resina Lava



Figura 2: Resina Filtek Z350XT



Figura 3: Resina Sinfony

Foram confeccionadas 18 amostras de cada composto (n=72). Para as resinas Filtek Z350XT e Sinfony utilizaram-se moldes de politetrafluoretileno (3mm de diâmetro e 2mm de profundidade), que foram encaixados entre duas

lâminas de vidro, com uma tira de poliéster entre a lâmina e a resina. Em seguida, uma pressão de 5N foi aplicada por 30 segundos. Para a resina Lava Ultimate foram cortados do bloco cubos com 2,08mm de altura, 2,08mm de largura e 2,08mm de profundidade. Para isso foi utilizada uma máquina de corte metalográfico (Extec, Enfield, CT, EUA) sob refrigeração a água. Para aferição das medidas foi utilizado um paquímetro digital (Starret, Athol, MA, EUA). Caso houvesse necessidade, a complementação do corte era realizada com um disco diamantado (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) montado em uma peça reta acoplada em um micromotor pneumático (Kavo, Joinville, SC, Brasil). O número de amostras está baseado em dados encontrados na literatura. Todas as amostras foram confeccionadas pelo mesmo operador. Para a equivalência das áreas de exposição das amostras, foi realizado o seguinte cálculo:  $A_{cilindro} = (\pi R^2) + 2\pi Rh$        $A_{cubo} = l^2 \times 6$



Figura 4: Paquímetro digital e amostras Lava

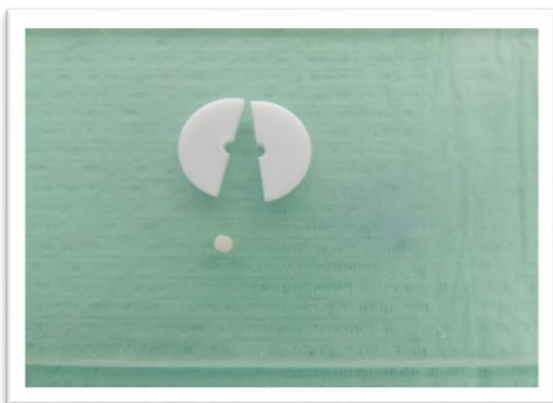


Figura 5: Matriz de teflon para demais amostras

As amostras foram divididas em quatro grupos, como segue:

Grupo FK: Filtek Z350XT polimerizada por 20s com LED (RadiiCal, SDI, Austrália), 1200mW/cm<sup>2</sup> em uma das faces.

Grupo S: Sinfony com polimerização adicional com luz e vácuo (Visio Alfa e Visio Beta, 3M ESPE, EUA)

Grupo L: Lava Ultimate (bloco pré-polimerizado para CAD/CAM)

Grupo FPA: Filtek Z350XT com polimerização adicional com luz e vácuo (Visio Alfa e Visio Beta, 3M ESPE, EUA)

HIPO: Hipoclorito de sódio a 1% usado como controle negativo.

DMEM: meio de cultura puro, sem suplementação, usado como controle positivo

As amostras não foram esterilizadas.

Tabela 2: Protocolo de polimerização

<i>Grupos</i>	<i>Método de polimerização</i>
<i>FK</i>	LED 20s encostado na amostra
<i>S</i>	Visio Alfa (10s luz) e Programa P1 Visio Beta (1 minuto luz e 14 minutos luz e vácuo)
<i>L</i>	Bloco polimerizado na fábrica
<i>FPA</i>	Visio Alfa (10s luz) e Programa P1 Visio Beta (1 minuto luz e 14 minutos luz e vácuo)

#### 4.2 Preparação dos extratos líquidos dos materiais

A metodologia de extração está de acordo com a ISO 10993 parte 5 – Testes para toxicidade *in vitro*. Foram usadas 4 placas de 24 poços (TPP®, Swisterland), onde as espécies avaliadas estiveram em contato com 600µL de meio DMEM não suplementado por um período de incubação de 24, 48 e 72 horas respectivamente. Após, o meio de cultura contendo o material extraído foi colocado em contato com as células.

#### 4.3 Linhagem celular, condições de cultura e densidade celular

Células de fibroblastos NIH/3T3 foram obtidas de ATCC (ATCC® Número: CRL-1658TM). A suspensão celular foi transferida para um frasco de cultura contendo *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)* com 10% de soro fetal bovino suplementado com penicilina/estreptomicina (100 U/mL/100 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL). Ao atingirem confluência de 70% as células foram lavadas com DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*), tripsinizadas e ressuspendidas em 1mL de DMEM. Foram contadas em câmara de Neubauer com Azul de Trypan. Após foram colocadas  $5 \times 10^4$  células com 200µL de meio DMEM para cada poço, em placa de 96 poços, mantendo-as em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Para cada tempo estudado foi realizado uma placa de 96 poços. Após 24 horas os poços com as células foram retirados, o meio lavado com DPBS e acrescentado os tratamentos a serem analisados nos respectivos poços e tempos.

Quatro culturas independentes foram usadas a cada tempo de tratamento. Cada placa de 96 poços foi incubada 24h nas condições descritas previamente para aderência celular e identificadas como segue: 24, 48 e 72 horas de tempo de exposição ao tratamento.

#### 4.4 Análise da redução do MTT

O teste de MTT foi realizado para análise da viabilidade celular, o qual tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzir o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (Across Organics, New Jersey, EUA)<sup>31</sup>, em cristais insolúveis de Formazan de coloração violeta.

Para a solubilização dos cristais de Formazan, 100µl de Dimetil Sulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço da placa de cultura. Logo após, foi realizada a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 570nm (Microplate Reader, Molecular Devices, SpectraMax® M5, EUA) suportado pelo programa Softmax Pro 5.2®.

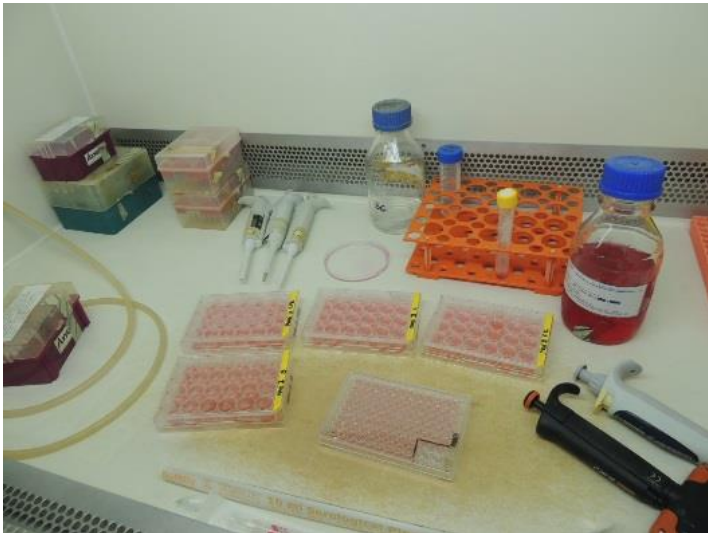


Figura 6: Placas contendo as amostras para extração do meio de cultura para análise



Figura 7: Preparo do meio de cultura

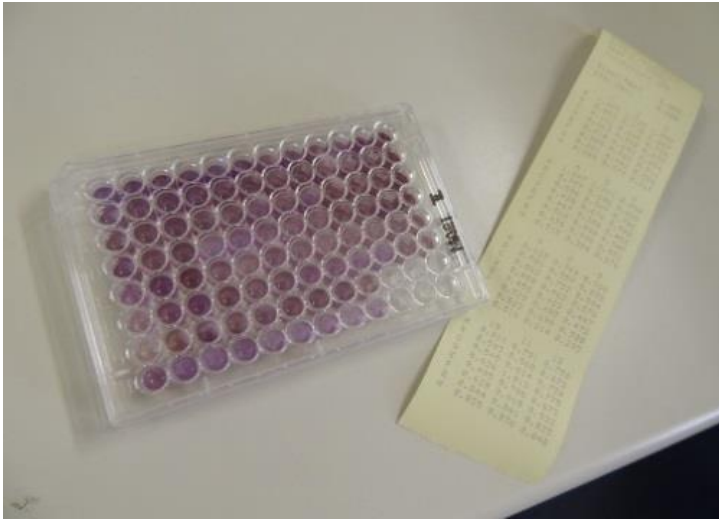


Figura 8: Placa após leitura com o resultado

#### 4.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *Statistical Package for the Social Sciences 13.0 for Windows* (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Os testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov ( $\alpha=0,05$ ) foram realizados para verificar a normalidade e homogeneidade dos dados. Teste ANOVA e Tukey em nível de 5% de significância foram empregados

## 5. RESULTADOS

Ao comparar os valores médios na Tabela 3, verificou-se que o grupo que tinha como material a resina Sinfony apresentou-se com a citotoxicidade mais baixa. Já a polimerização adicional para a resina Filtek Z350XT não apresentou diferença.

Um meio de cultura puro, sem tratamento, foi usado como controle positivo para sobrevivência celular. O Grupo **S** foi o único que teve os valores das médias de viabilidade sem diferir estatisticamente do grupo controle (DMEM), em todos os tempos analisados. O Grupo **FPA** foi o que teve os resultados mais distantes da média DMEM em todos os tempos.

Tabela 3: Médias dos valores de viabilidade celular

<b>Grupo \ Tempo</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
SINFONY (S)	1,186 <sup>Ab</sup> ( $\pm 0,116$ )	1,545 <sup>aA</sup> ( $\pm 0,068$ )	0,722 <sup>aC</sup> ( $\pm 0,086$ )
FILTEK (FK)	0,960 <sup>bB</sup> ( $\pm 0,119$ )	1,126 <sup>bA</sup> ( $\pm 0,138$ )	0,478 <sup>bC</sup> ( $\pm 0,027$ )
FILTEK PA (FPA)	0,742 <sup>cB</sup> ( $\pm 0,2108$ )	1,092 <sup>bA</sup> ( $\pm 0,293$ )	0,422 <sup>bcC</sup> ( $\pm 0,054$ )
LAVA (L)	0,863 <sup>bcB</sup> ( $\pm 0,141$ )	1,136 <sup>bA</sup> ( $\pm 0,204$ )	0,523 <sup>bC</sup> ( $\pm 0,069$ )
DMEM	1,183 <sup>aB</sup> ( $\pm 0,188$ )	1,702 <sup>aA</sup> ( $\pm 0,184$ )	0,700 <sup>aC</sup> ( $\pm 0,069$ )
HIPO	0,097 <sup>dC</sup> ( $\pm 0,320$ )	0,842 <sup>cA</sup> ( $\pm 0,105$ )	0,287 <sup>cB</sup> ( $\pm 0,018$ )

Médias seguidas por letra maiúscula distinta na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Médias seguidas por letra minúscula distinta na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

( ) Desvio padrão

No Gráfico 1 podemos observar o comportamento dos diferentes materiais nos três tempos analisados com relação à viabilidade celular.

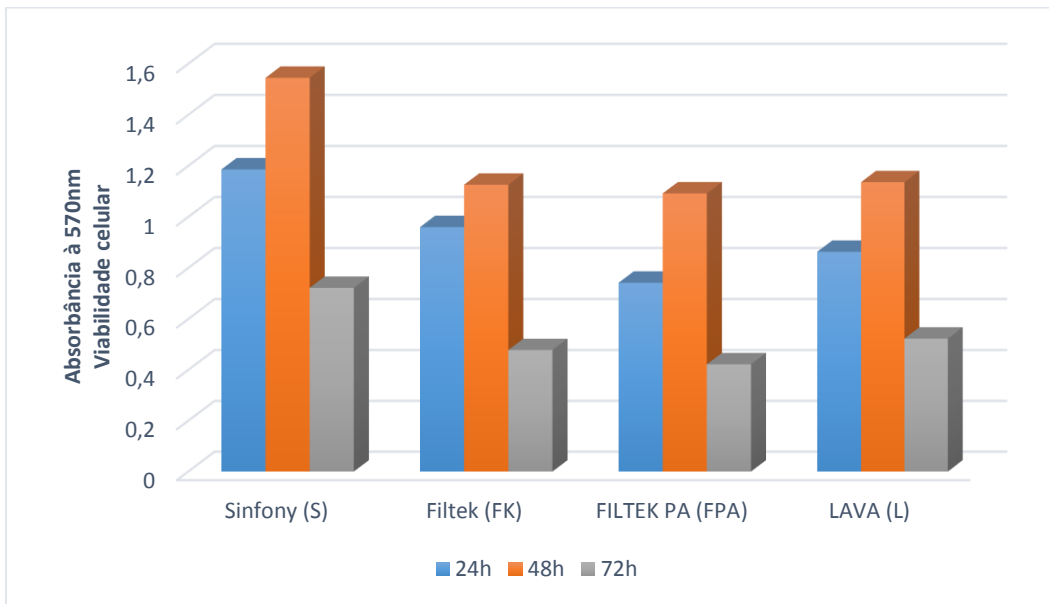


Gráfico 1: Valores médios com relação ao tempo de exposição celular

No Gráfico 2 têm-se os resultados do meio de cultura puro (DMEM), que é o controle positivo dos dados, e o hipoclorito, que por ser extremamente tóxico para as células foi usado como controle negativo

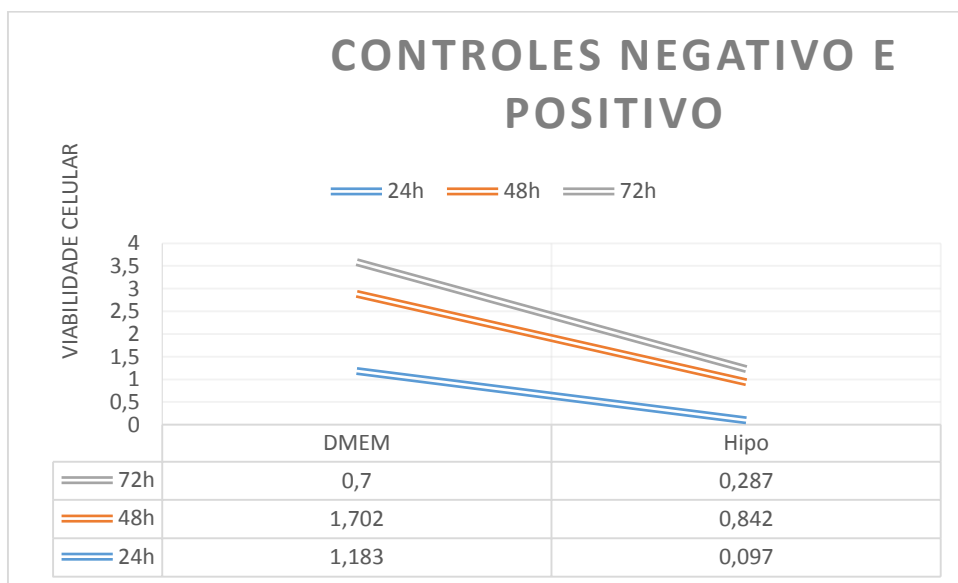


Gráfico 2: Valores médios de viabilidade celular para DMEM e hipoclorito



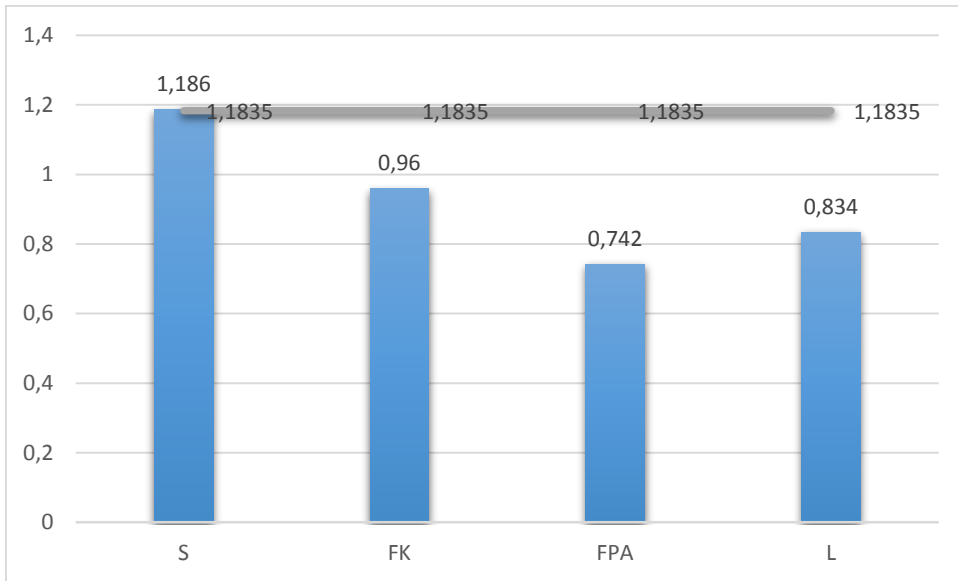


Gráfico 3: Média DMEM comparada às resinas na análise de 24h

## 6. DISCUSSÃO

Um dos problemas associados à polimerização inadequada ou insatisfatória é a liberação de monômeros residuais com potencial citotóxico. Porém, as investigações *in vitro* usam uma grande variedade de parâmetros. Determinar a viabilidade celular através do método MTT é rápido, fácil de executar e permite que um grande número de amostras seja analisado em uma remessa<sup>28</sup>.

Polimerização sob alta temperatura e pressão causa grande redução na liberação de monômeros residuais nos polímeros com UDMA<sup>42</sup>. No caso dos materiais analisados, todos possuem este elemento em suas composições. No trabalho de Karaarslan, Altintas, Bulbul, Cebe e Usumez (2011) verificou-se que o sistema de polimerização influencia na liberação de monômero, e os maiores valores liberados foram de TEGDMA e os menores de Bis-EMA. Estes dados se confirmaram em nosso estudo, pois as resinas Lava e Filtek Z350XT apresentaram resultados com médias inferiores quando comparadas à resina Sinfony, que possui apenas UDMA em sua composição.

A citotoxicidade dos monômeros das resinas tem sido avaliada com linhagem celular permanente de cultura primária de fibroblastos de várias origens como polpa, gengiva e ligamento periodontal<sup>34</sup>, dentre outros. Em geral, esta citotoxicidade pode ser classificada na seguinte ordem decrescente: Bis-GMA, UDMA, TEGDMA. Anand e Balasubramanian (2014) também afirmam ser o Bis-GMA o monômero com maior efeito citotóxico. Esta informação também está de acordo com o que foi encontrado em nossa pesquisa, uma vez que o resultado com maiores médias para citotoxicidade em todos os tempos foi obtido pela resina Sinfony, que não tem Bis-GMA e TEGDMA em sua matriz orgânica. Importante ressaltar que esta citotoxicidade está relacionada com o tipo e quantidade de componentes liberados<sup>28</sup>. Diferentes resinas compostas mostram sinais de citotoxicidade, embora em variados graus, provavelmente dependendo do percentual e qualidade dos ingredientes destas resinas<sup>24</sup>. UDMA e TEGDMA podem exercer toxicidade significativa e podem interagir entre si, produzindo efeitos diferentes daqueles esperados quando os mesmos agem sozinhos<sup>10</sup>.

Um estudo prévio de Karaarslan, Altintas, Bulbul, Cebe e Usumez (2011) constatou que a média de monômeros residuais liberados aumenta com o tempo.

Já Yildirin-Bicer, Ergun, Egilmez e Demirkoprulu (2013) constataram que os resultados de sobrevivência celular em 24 horas de incubação foram piores do que nos outros períodos. No presente estudo, observou-se uma maior média de sobrevivência quando a incubação foi de 48 horas, e a análise após 72 horas mostrou ser o período mais tóxico para todos os materiais testados, o que nos faz pressupor que componentes continuam sendo liberados das resinas ao longo do tempo.

Bakopoulou, Tsiftoglou, Galaktidou, Markala, Triviai e Garefis (2007) também observaram que as resinas processadas em laboratório para restauração indireta tiveram significativamente menor citotoxicidade em todos os pontos biológicos investigados. Estes dados vêm de encontro aos nossos. Porém, a resina composta direta quando polimerizada adicionalmente com luz e vácuo apresentou resultados menores de viabilidade celular do que quando polimerizada convencionalmente. Este resultado nos leva a crer que a pós-polimerização pode não ser efetiva para todas as resinas compostas em relação à citotoxicidade. Karaarslan, Altintas, Bulbul, Cebe e Usumez (2011) testaram uma mesma resina direta em diferentes situações de polimerização, tanto de forma direta quanto com um ciclo extra de polimerização. Em seus resultados a resina Filtek P60 polimerizada adicionalmente em autoclave, com calor e alta pressão apresentou o pior comportamento quanto à liberação de monômeros.

O fato de a resina Lava Ultimate ser polimerizada na fábrica não necessariamente garante que o seu grau de conversão seja maior do que as outras resinas, o que justificaria seu desempenho no presente teste no que diz respeito à toxicidade. Não há na literatura estudos de citotoxicidade com a mesma, mas uma ampla gama de avaliações de propriedades físicas e mecânicas. Os resultados apresentados pela resina Lava Ultimate foram muito parecidos com os da resina Filtek Z350XT, provavelmente devido ao fato de que a composição química das duas é a mesma. A diferença é que a resina Lava Ultimate é polimerizada na fábrica.

Sevkusic *et al* (2014) definiram produto da dissolução como substâncias que são liberadas ou lavadas das resinas compostas, e produtos da degradação substâncias formadas durante o processo de dissolução com o diluente. Em sua análise, após 180 dias todas as substâncias liberadas das resinas compostas

foram identificadas como produtos da dissolução. Bakopoulou Tsiftoglou, Galaktidou, Markala, Trivai e Garefis (2007) afirma que como não se sabe a quantidade de componentes que são liberados pelas resinas *in vivo* e em que medida elas são diluídas, inativadas e ainda capazes de induzir respostas biológicas, deve-se ter cuidado com a interpretação dos resultados.

Como todo estudo *in vitro*, o presente trabalho possui limitações. Sugerimos, para a resina Filtek Z350 alterar o protocolo de polimerização adicional para 20s com LED seguido de polimerização com Visio Beta. Em relação à resina Lava também pode ser realizada uma polimerização adicional para avaliar se há uma melhora em sua citotoxicidade.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e cientes da limitação de um estudo *in vitro*, podemos concluir que:

- A resina Sinfony apresentou a menor citotoxicidade dentre os três materiais analisados
- Uma polimerização adicional por luz e vácuo na resina Filtek Z350XT não melhora seu efeito para citotoxicidade quando comparado a polimerização direta da mesma
- A resina para CAD-CAM (Lava Ultimate) não apresentou diferença de citotoxicidade quando comparada à resina Filtek Z350XT com ou sem polimerização adicional.

## REFERÊNCIAS

1. Durner J, Spahl W, Zaspel J, Schweikl H, Hickel R, Reichl FX. Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their Nernst partition coefficient. *Dent Mater.* 2010;26:91-99.
2. Sharma S, Padda BK, Choudhary V. Comparative evaluation of residual monomer content and polymerization shrinkage of a packable composite and on ormorcer. *J Conserv Dent.* 2012;15(2):161-165.
3. Leprince JG, Palin WM, Hadis MA, Devaux J, Leloup G. Progress in dimethacrylate-based dental composite technology and curing efficiency. *Dent Mater.* 2013;29:139-156.
4. Nandini S. Indirect resin composites. *J Conserv Dent.* 2010;13(4):184-194.
5. Sigusch BW, Völpel A, Braun I, Uhl A, Jandt KD. Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composites. *Dent Mater.* 2007;23:1342-1348.
6. Davidson CL, De Gee AJ. Light-curing units, polymerization, and clinical implications. *J Ades Dent.* 2000;2:167-173.
7. Gagliani M, Fadini L, Ritzmann JM. Depth of cure efficacy of high-power curing devices vs. traditional halogen lamps. *J Ades Dent.* 2002;4:41-47.
8. Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials.* 2013;34:4555-4563.
9. Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2010;26:51-58.
10. Wisniewska-Jarosinska M *et al.* Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Mol Biol Rep.* 2011;38:4603-4611.

11. Ergun G, Egilmez F, Cekik-Nagas I. The cytotoxicity of resin composites cured with three light curing units at different curing distances. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(2):252-259.
12. Sigusch BW *et al*. Resin-composite cytotoxicity varies with shade and irradiance. *Dent Mater*. 2012;28:312-319.
13. Beriat NC, Ertan AA, Canay S, Gurpinar A, Onur MA. Effect of different polymerization methods on the cytotoxicity of dental composites. *Eur J Dent*. 2010;4:287-292.
14. Ak AT, Alpoz AR, Bayraktar O, Ertugrul F. Monomer release from resin based dental materials cured with LED and halogen lights. *Eur J Dent*. 2010;4:34-40.
15. Kakaboura A, Rahiotis C, Zinelis S, Al-Dhamadi YA, Silikas N, Watts DC. In vitro characterization of two laboratory-processed resin composites. *Dent Mater*. 2003;19:393-398.
16. Roulet JF. Benefits and disadvantages of tooth coloured alternatives to amalgam. *J Dent*. 1997;25:459-473.
17. Edelhoff D, Beuer F, Schweiger J, Brix O, Stimmelmayer M, Güth JF. CAD/CAM-generated high-density polymer restorations for the pretreatment of complex cases: a case report. *Quintessence Int*. 2012;43:457-467.
18. Stawarczyk B, Krawczuk A, Ilie N. Tensile bond strength of resin composite repair in vitro using different surface preparation conditionings to an aged CAD/CAM resin nanoceramic. *Clin Oral Investig*. 2015;19(2):299-308.
19. Batalha-Silva S, Andrada MAC, Maia HP, Magne P. Fatigue resistance and crack propensity of large MOD composite resin restorations: Direct versus CAD/CAM inlays. *Dent Mater*. 2013;29:324-331.
20. Stawarczyk B, Özcan M, Trottmann A, Schmutz F, Roos M, Hämmerle C. Two-body wear rate of CAD/CAM resin blocks and their enamel antagonists. *J Prosthet Dent*. 2013;109(5):325-332.

21. Blasiak J, Kasznicki J, Drzewoski J, Pawlowska E, Szczepanska J, Reiter RJ. Perspectives on the use of melatonin to reduce cytotoxic and genotoxic effects of methacrylate-based dental materials. *J Pineal Res.* 2011;51:157-162.
22. Shehata M. *et al.* Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2013;29:971-979.
23. Pawlowska E, Poplawski T, Ksiazek D, Szczepanska J, Blasiak J. Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. *Mutat Res.* 2010;696:122-129.
24. Ausiello P. *et al.* Cytotoxicity of dental resin composites: an in vitro evaluation. *J Appl Toxicol.* 2013;33:451-457.
25. Sevkusic M *et al.* The elution and breakdown behavior of constituents from various light-cured composites. *Dent Mater.* 2014;30:619-631.
26. Venhoven DAM; De Gee AJ, Davidson L. Polymerization contraction and conversion of light-curing BisGMA-based methacrylate resins. *Biomaterials.* 1993;14(11):871-875.
27. Emmler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K. Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater.* 2008;24:1670-1675.
28. Darmani H, Al-Hiyasat AS, Milhem MM. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. *Quintessence Int.* 2007;38(9):789-795.
29. Karaarslan ES, Altintas S, Bulbul M, Cebe MA, Usumez A. High performance liquid chromatography analysis of monomers from one composite resin cured with different polymerization methods. *Mat Res Innov.* 2011;15(2):124-129.
30. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:333-355.



31. Yildirim-Bicer AZ, Ergun G, Egilmez F, Demirkoprulu H. *In vitro* cytotoxicity of indirect composite resins: Effect of storing in artificial saliva. *Indian J Dent Res.* 2013;24(1):81-86.
32. Bouilliaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine systems, *in vitro*. *J Oral Rehabil.* 1998;25:45-51.
33. Bakopoulou A, Tsiftoglou A, Galaktidou DM, Markala D, Trivai I, Garefis P. Patterns of cell death and cell cycle profiles of cultured WEHI 13 var fibroblasts exposed to eluates of composite resins used for direct and indirect restorations. *Eur J Oral Sci.* 2007;115:397-407.
34. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater.* 2006;22:1086-1092.
35. Anand V S, Balasubramanian V. Effect os resin chemistry on depth of cure and cytotoxicity of dental resin composites. *Mat Sci Eng.* 2014;181:33-38.
36. Chang M-H *et al.* The effect of BisGMA on cyclooxygenase-2 expression, PGE<sub>2</sub> production and cytotoxicity via reactive oxygen species- and MEK/ERK-dependent and -independent pathways. *Biomaterials.* 2009;30:4070-4077.
37. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for the assesment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol.* 2005;25:101-108.
38. Santos PH, Souza FI, Guedes APA, Pavan S. Effect of postpolymerization method on the color stability of composite resins submitted to ultraviolet aging. *Quintessence Int.* 2012;32(3):95-100.
39. Souza ROA *et al.* Conversion degree of indirect resin composites and effect of thermocycling on their physical properties. *J Prosthodont.* 2010;19:218-225.
40. Cetin A R, Unlu N. Clinical wear rate of direct and indirect posterior composite resin restorations. *Quintessence Int.* 2012;32(3):87-94.

41. Janda R, Roulet JF, Kaminsky M, Steffin G, Latta M. Color stability of resin matrix restorative materials as a function of the method of light activation. *Eur J Oral Sci.* 2004;112:280-285.
42. Phan AC, Tang M, Nguyen JF, Ruse ND, Sadoun M. High-temperature high-pressure polymerized urethane dimethacrylate – Mechanical properties and monomer release. *Dent Mater.* 2014;30:350-356.
43. Hooshmand T, Parvisi S, Keshshvad A. Effect of surface acid etching on the biaxial strength of two hot-pressed glass ceramics. *J Prosthodont.* 2008;17:415-419.
44. Kassem AS, Atta O, El-Mowafy O. Fatigue resistance and microleakage of CAD/CAM ceramic and composite molar crowns. *J Prosthodont.* 2012;21:28-32.
45. Magne P, Schlichting LH, Maia HP, Baratieri LN. In vitro fatigue resistance of CAD/CAM composite resin and ceramic posterior occlusal veneers. *J Prosthet Dent.* 2010;104:149-157.