

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Virgínia Angelica Silva

ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E DO GRAU DE CONVERSÃO
DE RESINAS COMPOSTAS DE METACRILATO E DE SILORANO

Belo Horizonte

2012

Virgínia Angelica Silva

ANÁLISE DA CITOXICIDADE E DO GRAU DE CONVERSÃO DE
RESINAS COMPOSTAS DE METACRILATO E DE SILORANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Linha de pesquisa: Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Thadeu de Abreu Poletto

Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Henriques Alvim

Belo Horizonte

2012

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Luiz Thadeu**, meu orientador, mestre e amigo. Você fez com que meu mestrado fosse mais que uma pesquisa científica! Obrigada pelas oportunidades, incentivos, conselhos. Cada detalhe de minha formação tem um toque seu, e eu sou muito grata por isso...

Ao **Prof. Dr. Hugo**, meu co-orientador. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, carinho, atenção e tranquilidade em meio às dificuldades.

À **Profa. Dra. Maria Esperanza**, grande colaboradora desse trabalho. Obrigada pela confiança depositada, atenção e orientações. Serei eternamente grata!

Ao **Dr. Alexandre Gatti**, químico da Universidade de Araraquara, pela valiosa e fundamental colaboração nas etapas finais deste trabalho. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos *pais, irmãos e sobrinha* pelo sincero amor e por acreditarem e me apoiarem incondicionalmente.

Ao *André*, por já ser parte fundamental da minha vida. Seu carinho, paciência e incentivo foram essenciais nessa caminhada.

Sávio, não há palavras que explicitem minha gratidão. Obrigada pela parceria e por me acompanhar e orientar em cada passo desse trabalho. Você foi quase um “orientador” para mim...Muito obrigada!

A todos os professores de Dentística da FO-UFMG, em especial: *Rogéli, Rodrigo, Hebert, Paty e Lincoln*, obrigada por todo carinho, ensinamentos e acolhimento! Vocês contribuíram muito com minha formação e eu espero um dia fazer parte desse “time”.

Aos que foram meus *alunos na disciplina Fundamentos da Prática Odontológica*. Obrigado por instigarem em mim a vontade ainda maior de ser professora, e me permitirem com muito carinho participar do aprendizado de vocês!

Aos *pacientes* atendidos durante o mestrado. Obrigada por participarem de minha formação e pela paciência durante a execução dos casos clínicos!

Aos amigos do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais da Química: *Karina, Kellen, Juliana, Diego, Jéssica* obrigada por me receberem com tanta paciência.

E também aos amigos da Odonto. *Graciene* obrigada pela parceria fiel; *Esdras* com você o mestrado foi mais engraçado; *Vivi* sua calma e segurança me

tranqüilizaram muitas vezes. E a todos os outros colegas da pós-graduação! *Dri, Geovane e Luís*, a amizade de vocês foi fundamental, adorei ter tido vocês por perto!

À minha amiga *Andrea Dias* que sempre me deu força. As palavras boas nos momentos difíceis.

Ao *Ricardo Reis*, pelos ensinamentos e ponta-pé inicial ainda quando eu era sua aluna de iniciação científica.

Às funcionárias da pós-graduação *Beth, Laís e Zuleica* pela disponibilidade. E aos funcionários *Euclides, Vanessinha, Gió, Lurdinha e Bruno* conversar e rir com vocês foi essencial! Obrigada vocês também...

Ao colegiado de pós-graduação, em nome do *Prof. Saul Martins de Paiva*.

Às agências de fomento *CNPq, FAPEMIG e INCT NanoBiofar* pelo apoio financeiro.

À empresa *3M ESPE* aos cuidados de *Fernanda*, pelo fornecimento das resinas compostas necessárias para esta pesquisa.

À representante da empresa *Vigodent, Cristina*, que me emprestou por um longo período o LED para que eu pudesse fazer os experimentos.

A *Deus* por iluminar e proteger meu caminho.

Por fim, mas não menos importante, aos *familiares, e amigos*. A vida ao lado de vocês é mais feliz! Amo a todos!

“Há muito que não sei, mas não há nada que eu não possa aprender.”

M. K. Gandhi

RESUMO

Compósitos a base de Silorano vêm apresentando bons resultados mecânicos em diversos estudos laboratoriais, mas pouco se sabe ainda sobre seus efeitos sobre as células do tecido gengival e seu grau de conversão. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade celular e o grau de conversão de uma resina composta a base de silorano (Filtek P90 – 3M ESPE) e de três resinas convencionais de metacrilato (Filtek Z350XT- 3M ESPE; Filtek Z100- 3M e Filtek Z250- 3M ESPE), todas fotopolimerizadas por 20 ou 40 segundos pelo LED (Flash lite DISCUS), em cultura primária de fibroblastos gengivais. Avaliou-se também se existe correlação entre grau de conversão e viabilidade celular. Para tanto, foram confeccionados seis espécimes (n=6) de cada compósito, a partir de um molde. O metabolismo celular foi avaliado após 24 h por meio do teste de MTT (metiltetrazólio), onde $1,5 \times 10^5$ células/poço foram semeadas em placas de 96-poços, e após 48h, colocadas em contato com o extrato proveniente da incubação prévia dos espécimes de resina composta por 24h ou 12 dias. O grau de conversão foi analisado por meio de FTIR. Análise de variância (ANOVA) com correção de Bonferroni ($p < 0,05$) foi realizada para comparar os grupos. Resultados mostraram que somente a resina Filtek Z100, nos dois tempos de polimerização estudados, foi citotóxica, sendo que a variação no tempo de incubação dos compósitos não causou alteração na viabilidade celular. Com relação ao grau de conversão, o compósito que apresentou menor valor foi Filtek Z250 e o maior valor foi do compósito Filtek P90. Os compósitos Filtek Z100 e Filtek P90 apresentaram maior grau de conversão quando polimerizados por 40s do que por 20s, já os compósitos Filtek Z250 e Filtek Z350XT não demonstraram diferenças. Não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa entre viabilidade celular e grau de conversão.

Palavras-chave: Silorano; citotoxicidade; fibroblastos gengivais; FTIR.

ABSTRACT

Analysis of the cytotoxicity and the degree of conversion of composite resins based methacrylate and silorane.

The composite based Silorane come with good mechanical results in several laboratory studies, but the knowledge about their effects on cells of the gingival tissue and the degree of conversion is not well established yet. The objective of this study was to evaluate cell viability and degree of conversion of a composite resin base silorane (Filtek P90 3M ESPE) and three conventional methacrylate resins (Filtek Z350XT 3M ESPE, Filtek Z100 3M ESPE and Filtek Z250 3M ESPE), all light-cured for 20 and 40 seconds with LED light curing unit (Flash lite DISCULS), in primary cultures of gingival fibroblasts. We also assessed the possibility of a correlation between the degree of conversion and the cell viability. For this purpose six specimens (n = 6) of each composite were prepared from a mold. Cellular metabolism was evaluated after 24 hrs by MTT test (metiltetrazólio), in witch 1.5×10^5 cells/well were seeded in 96-well plates and, after 48 hours, placed in contact with the storage medium from the preincubation specimens of composite resin for 24 hours or 12 days. The degree of conversion was analyzed by FTIR test Fourier transform and the analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction ($p < 0.05$) was performed to compare the groups. The research showed that only the resin Filtek Z100 was cytotoxic when photocured in both studied periods and the variation in time of incubation of the composite did not alter the cellular viability. Regarding the degree of conversion, Filtek Z250 was the composite with the lowest value and Filtek P90 the one with the highest. The composites Filtek Z100 and Filtek P90 showed higher degree of conversion when polymerized for 40s than 20s, whereas the composites Filtek Z250 and Filtek Z350XT showed no differences. We found no statistically significant correlation between cell viability and degree of conversion.

Keywords: Silorane; citotoxicity; FTIR; gingival fibroblasts

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura molecular do monômero de Silorano.....	5
Figura 2- Resinas compostas avaliadas	28
Figura 3- Confeção dos corpos de prova	30
Figura 4- Confeção dos corpos de prova	30
Figura 5- Confeção dos corpos de prova	30
Figura 6- Dispositivo de LED e Radiômetro utilizados	31
Figura 7- Pratos de acrílico com os corpos de prova imersos em meio de cultura	32
Figura 8- Aspecto colorimétrico da placa de cultura após realização do MTT – 24 h.....	34
Figura 9- Aspecto colorimétrico da placa de cultura após realização do MTT – 12 d.....	35
Figura 10- Células jovens.....	38
Figura 11- Semelhança com fibroblastos.....	38
Figura 12- Confluência celular	38
Figura 13- Espectro resultante do grau de conversão dos compósitos de metacrilato	42
Figuras 14 - Espectro resultante do compósito de Silorano, evidenciando a banda analítica utilizada no cálculo do seu grau de conversão	43
Figura 15- Espectro resultante do compósito de Silorano, evidenciando o padrão interno utilizado no cálculo do seu grau de conversão	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resinas compostas utilizadas	29
Tabela 2- Relação entre grupos experimentais de acordo com os períodos de avaliação e o número de espécimes	32
Tabela 3- Gradação da citotoxicidade em relação ao percentual de sobrevivência celular	36

LISTA DE ABREVIATURAS, E SIGLAS

°C- Graus Celsius (celsius degrees)

ANOVA- Analysis of variance (análise de variância)

BisGMA- Bisfenol A- diglicidil éter dimetacrilato

cm- Centímetro (centimeter)

CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂- Dióxido de carbono (carbon dioxide)

COEP- Comitê de Ética em Pesquisa

DC- Grau de conversão

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO- Dimetilsulfóxido

EDTA- Ethylenediaminetetracetic acid sodium (ácido etileno diamino tetracético sal dissódico)

EUA- Estados Unidos da América

FAPEMIG- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FBS- Fetal bovine serum (soro fetal bovino)

FIB- Fibroblastos gengivais

FOUFMG- Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais

FTIR- Attenuated Total Reflection-Fourier-transform IR Spectroscopy

h- Hora (hour)

H₂O- Água

HEMA- Hidroxietilmetacrilato

IL-6 e IL-8- Interleucinas 6 e 8.

INCT- NanoBiofar Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica

J- Joule

J/cm²- Joule por centímetro quadrado (Joule per centimeter square)

L929- Linhagem imortalizada de fibroblastos de ratos

LED- Light emitting diode (diodo emissor de luz)

M- Molar

MDPC-23- Mouse dental papilae cells (linhagem imortalizada de células odontoblastóides de ratos)

mg- Miligrama

mg/ml- Miligrama por mililitro

min- Minuto (minute)

ml- Mililitro (milliliter)

mm- Milímetro

mM- Milimolar

MTT- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromide)(metiltetrazólio)

mW- Milliwatt

mW/cm²- Milliwatt por centímetro quadrado (milliwatt per centimeter square)

nm- Nanômetro

PBS- Phosphate buffered saline (solução salina tamponada)

PGE₂- Prostaglandina E₂

rpm- Rotações por minuto

s- Segundo (second)

SDS- Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

TEGDMA- Trietileno Glicol Dimetacrilato

UDMA- Uretano Dimetacrilato

USA- United States of America

UV- Radiação ultravioleta

v/v- Volume por volume (volume per volume)

vol- volume

W- Watt

µg/ml- Micrograma por mililitro (microgram per milliliter)

µl- Microlitro (microliter)

µm- Micrometro (micrometer)

µM- Micromolar

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Porcentagem de viabilidade celular após 24 horas de contato indireto com as resinas avaliadas medida por meio do ensaio de MTT.....	39
Gráfico 2- Porcentagem de viabilidade celular após 12 dias de contato indireto com as resinas avaliadas medida por meio do ensaio de MTT	40
Gráficos 3, 4, 5 e 6- Comparação da citotoxicidade dos compósitos de acordo com a variação no tempo de incubação	41
Gráfico 7- Comparação do grau de conversão da resina Filtek Z100, fotopolimerizada nos tempos de 20 e 40s	44
Gráfico 8: Comparação do grau de conversão da resina Filtek P90, fotopolimerizada nos tempos de 20 e 40s	45
Gráfico 9: Comparação do grau de conversão da resina Filtek Z350XT, fotopolimerizada nos tempos de 20 e 40s	45
Gráfico 10: Comparação do grau de conversão da resina Filtek Z250, fotopolimerizada nos tempos de 20 e 40s	46
Gráfico 11: Comparação do grau de conversão de todos os compósitos utilizados	46

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO DE LITERATURA	5
3-OBJETIVOS	26
4-METODOLOGIA	27
4.1-Aspectos Éticos e Legais	27
4.2-Seleção dos Casos	27
4.3-Extração dos Fibroblastos gengivais.....	27
4.4-Confeção dos corpos de prova.....	28
4.5-Cultivo das células e avaliação do metabolismo celular.....	33
4.6-Avaliação do grau de conversão	36
5-RESULTADOS	38
6-DISCUSSÃO	47
7-CONCLUSÕES	59
8-REFERÊNCIAS	60
9-APÊNDICES	70
APÊNDICE 1	70
APÊNDICE 2	71
APÊNDICE 3	72
APÊNDICE 4	73

1. INTRODUÇÃO

Materiais resinosos têm sido usados na Odontologia para restaurar dentes desde a introdução da primeira resina composta no mercado, na década de 60, com o trabalho pioneiro de Bowen (Bowen, 1963). Resinas compostas consistem de partículas de carga embebidas em uma matriz resinosa orgânica quimicamente reativa. Partículas de carga são materiais tipicamente inorgânicos, como vidro ou quartzo, que são geralmente tratados na sua superfície (silanizados), possibilitando a união química à matriz de resina. Quase todas as resinas compostas utilizam dimetacrilatos, tais como TEGDMA, Bis-GMA ou UDMA, que são polimerizados por radicais, como a resina primária.

Em muitos tipos de cavidades, resinas compostas são consideradas materiais versáteis e confiáveis para o uso em restaurações diretas e indiretas e têm sido comumente utilizadas. Entretanto, muitos problemas como os efeitos deletérios da contração de polimerização, propriedades mecânicas inadequadas e a resistência insuficiente em grandes restaurações oclusais permanecem (Leprince et al., 2010).

Apesar da aceitável performance clínica dos compósitos à base de metacrilato, a contração de polimerização ainda é um obstáculo. A contração de polimerização gera uma contração volumétrica do material, o que resulta em “stress” nas restaurações adesivas e pode levar à deformação de cúspides, microinfiltração, diminuição da adaptação marginal, trincas no esmalte, sensibilidade pós-operatória e cáries recorrentes (Duarte Jr. et al., 2009).

É marcante que, durante essas décadas de avanço, a contração de polimerização foi diminuída apenas discretamente. Reduzir a contração de polimerização de resinas compostas sem comprometer as propriedades físicas e de manipulação continua sendo o maior desafio dos cientistas que trabalham com esses materiais. A contração de polimerização do material restaurador depende do seu conteúdo de carga (Li et al., 1985), do tipo de carga (Tarumi et al., 1995) e da composição da matriz resinosa (Braga et al., 2005). Além da

adoção da técnica incremental, existem outros meios para minimizar os efeitos da contração na interface dente/restauração, como diferentes técnicas de fotoativação (Uhl et al., 2005), aumento do conteúdo da carga inorgânica (Aw et al., 2001) ou o uso de novos monômeros com baixa contração (Eick et al., 2007).

Uma alternativa recente, lançada no mercado em 2007 pela 3M ESPE, consiste em uma nova resina composta contendo o monômero silorano (Filtek P90 3M ESPE) (Guggerberger et al., 2000, Eckert et al., 2004). Esse compósito baseia-se na substituição dos monômeros de metacrilato por sistemas epóxicos de abertura de anel- silorano (Leprince et al., 2010). O monômero de silorano é obtido pela reação de oxirano e siloxano e mostrou ter contração volumétrica de apenas 0,99% (vol) (Al-boni et al., 2010), enquanto compósitos de metacrilato têm uma média de contração em torno de 2,3 a 3 % (vol) (Duarte Jr. et al., 2009). O componente siloxano confere ao material alta hidrofobia, enquanto o componente oxirano tem alta reatividade e menor contração de polimerização (Yesilyurt et al., 2009).

A combinação dos dois componentes químicos, siloxano e oxirano oferece a biocompatibilidade, hidrofobia e baixa contração da base silorano da resina composta posterior de baixa contração Filtek P90 (Palin et al., 2004). Essa inovadora matriz de resina representa a maior diferença da Filtek P90 quando comparada aos metacrilatos convencionais.

As maiores vantagens desse novo material restaurador são: ele reduz a contração de polimerização e suas propriedades mecânicas são comparáveis aos compósitos de metacrilato (Duarte Jr. et al., 2008; Boaro et al., 2010). Um material restaurador deve ser avaliado não somente em termos de suas propriedades físicas e mecânicas, mas também em termos de sua biocompatibilidade e citotoxicidade. Esse, quando inserido na cavidade oral, deve ser inofensivo a todos os tecidos incluindo gengiva, mucosa, polpa e osso.

Citotoxicidade de uma resina composta está relacionada tanto com sua composição química quanto com a porcentagem de conversão dos seus monômeros. Monômeros residuais e outros componentes, como iniciadores ou ativadores, são liberados de materiais resinosos incompletamente polimerizados. Desses incluem-se resinas compostas, sistemas adesivos, ionômeros de vidro modificados, cimentos de ionômero de vidro e selantes. Segundo Darmani et al. (2007), a citotoxicidade de um compósito depende de sua composição, da quantidade e tipo de “componentes lixiviados/ liberados” (monômeros livres não polimerizados), durante a degradação ou erosão inerente ao ambiente oral ao longo do tempo.

Uma eficiente polimerização dos compósitos é um parâmetro crítico, não somente por assegurar ótimas propriedades físicas à restauração final, mas também por assegurar que problemas clínicos não surjam como resultado da citotoxicidade de materiais inadequadamente polimerizados, uma vez que se verificou que a toxicidade dos compósitos observada nas células/organismos não é causada pela molécula principal, mas pelos intermediários tóxicos formados no metabolismo dos compostos dentais incompletamente polimerizados (Kong et al., 2009). Conforme Ergun et al., (2011) um alto grau de conversão (DC) de um compósito garante a ele boas propriedades mecânicas e biológicas. Além do que, uma medição exata de DC é essencial para mostrar a relação entre grau de conversão e propriedades mecânicas, bem como o potencial de liberação de monômeros não reagidos de compósitos, quando a conversão é incompleta (Gauthier et al., 2005).

Monômeros residuais são liberados de muitos materiais restauradores resinosos na cavidade oral, após a polimerização, em quantidades que variam de microgramas a miligramas. Esses “componentes lixiviados” podem causar sérios efeitos adversos no organismo, como: irritação das mucosas, proliferação epitelial, reação liquenóide oral, hipersensibilidade e reações anafiláticas (Moharamzadeh et al., 2007). Hanks et al., (1991) mostraram que monômeros como BisGMA em altas concentrações podem suprimir a síntese de proteínas e induzir morte celular. Issa et al.,(2008) relataram que reações liquenóides na mucosa oral têm sido observadas adjacentes a restaurações

com compósitos resinosos; e que a presença de exsudato gengival ao redor de superfícies intactas de esmalte foi menor que ao redor de restaurações com resina composta durante um período de sete dias de gengivites experimentais. Já Schmalz et al., (1998), demonstraram que mediadores inflamatórios como PGE₂, IL-6 e IL-8 são liberados por culturas de tecidos humanos orais, após exposição a materiais dentais.

Devido à severa citotoxicidade dos tradicionais compósitos de metacrilato, indústrias estão desenvolvendo novos materiais e novas estratégias. Materiais com base na tradicional química do metacrilato são severamente citotóxicos, enquanto materiais com recentes químicas (ex. silorano, ormocer) têm apresentado melhora com o tempo (Franz et al., 2008). Em 2003, Chen et al., mostraram que o monômero de BisGMA é o que apresenta maior citotoxicidade, seguido principalmente pelos monômeros UDMA, TEGDMA e HEMA, sendo verificado que interações entre esses monômeros potencializam a citotoxicidade de cada um.

Apesar de já ter sido constatada a severa citotoxicidade dos tradicionais compósitos de metacrilato, pouco se sabe ainda sobre os efeitos citotóxicos das resinas a base de silorano. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico, sobre cultura primária de fibroblastos gengivais, de diferentes resinas compostas empregadas em Odontologia restauradora, as quais foram mantidas por dois períodos experimentais em solução aquosa. Foi analisada também a existência de uma possível correlação entre viabilidade celular e grau de conversão desses materiais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resinas compostas a base de Silorano

Silorano é uma nova classe de compósitos para uso em Odontologia. O nome “Silorane” é derivado da suas moléculas constituintes em inglês - *siloxanes* (siloxanos) e *oxiranes* (oxiranos). A combinação dos dois componentes químicos: siloxano e oxirano oferecem a biocompatibilidade, hidrofobia e baixa contração da base silorano da Filtek P90 3M ESPE (Catálogo 3M ESPE).

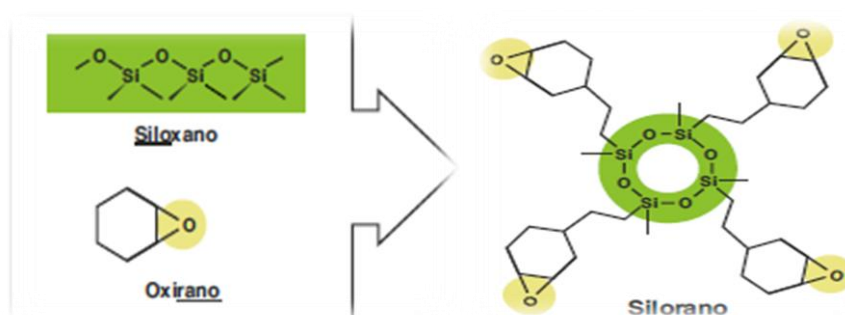


Fig. 1 Estrutura molecular do monômero de silorano

Siloxanos são bem conhecidos por suas aplicações industriais devido à sua distinta hidrofobia. Oxiranos, devido à sua leveza e resistência, têm sido usados por muito tempo em muitas áreas técnicas, especialmente quando grandes forças e ambientes físicos desafiadores são esperados, tais como na confecção de equipamentos para esportes, como raquetes de tênis ou esquis, ou nas indústrias automotiva e de aviação (Catálogo 3M ESPE).

A resina a base de silorano foi lançada em 2007 pela 3M ESPE, para representar essa nova classe de compósitos com menor contração de polimerização. Ela é comercializada com diferentes nomenclaturas nos vários países: Filtek P90 no Brasil, Filtek Silorane nos EUA e Filtek Low Shrinkage (LS) na Europa, acompanhada com seu adesivo próprio LS System Adhesive. Sua composição baseia-se em: monômero de silorano; sistema iniciador: canforoquinona, sal iodônio, doador de elétron; estabilizadores e pigmentos. Essa resina é carregada com uma combinação de finas partículas de quartzo e

fluoreto de ítrio radiopaco. Do ponto de vista das partículas, a resina Filtek P90 é classificada como uma resina microhíbrida, uma vez que apresenta partículas com tamanho médio de 0,47µm.

O sistema iniciador do compósito de Silorano é composto por três componentes: canforoquinona, sais iodônio e doadores de elétrons. A canforoquinona foi usada como fotoiniciador devido ao seu amplo espectro de absorção, compatível com todos os aparelhos fotoiniciadores existentes no mercado. Durante a reação, doadores de elétrons agem em um processo de redução, e decompõem os sais de iodônio em cátions ácidos, que iniciam o processo de abertura de anel do oxirano (Weinmann et al., 2005).

O processo de polimerização da Filtek P90 ocorre através de uma reação catiônica de abertura de um anel, que resulta em uma menor contração de polimerização, quando comparado às resinas de metacrilato, que polimerizam por meio de uma reação de adição de radicais por ligações duplas. Em contraste aos grupos reativos lineares dos metacrilatos, a química de abertura do anel dos siloranos inicia-se com a clivagem dos anéis. Esse processo aumenta o tamanho da molécula e compensa a perda de volume que ocorre no passo subsequente, quando ligações químicas são formadas.

Estudos descritos a seguir demonstram algumas propriedades importantes e diferenciais das resinas a base de silorano em relação às resinas convencionais de metacrilato.

Weimann et al. (2010) compararam a força de contração e a alteração dimensional sofrida por um compósito experimental de Silorano (Sil Flow 3M ESPE) com quatro compósitos de metacrilato (Tetric Evoflow- Ivoclar; Venus Flow- Heraeus Kulzer; Grandio Flow- VOCO e X-Flow- Dentsply). Foram preparadas cavidades de 8mmx2mmx2,5mm em blocos de alumínio, e estas preenchidas com os compósitos testados, após a realização do pré-tratamento das cavidades com os devidos adesivos. A alteração dimensional foi então mensurada 60 min após a fotopolimerização por um dispositivo transdutor colocado na parede cavitária, sendo a força de contração de polimerização

também mensurada nos mesmos espécimes, através do método do disco aderido. Concluiu-se então que não existe correlação direta entre força de contração e alteração dimensional, mas que o compósito de silorano revelou no mesmo período, o menor valor de força de contração e a menor alteração dimensional entre todos os materiais testados.

Boaro et al. (2009) avaliaram a contração volumétrica e o stress de polimerização de compósitos com diferentes composições de matriz orgânica. Foram testados sete compósitos a base de Bis-GMA, um a base de silorano e um a base de “dimetacrilato ácido”. Para mensuração da contração volumétrica foi usado um dilatômetro, e para obtenção do stress de polimerização, os compósitos foram inseridos entre rodas de PMMA. Os resultados mostraram que o compósito de silorano apresentou menor contração volumétrica, mas um dos maiores valores de stress de polimerização.

O stress de polimerização associado à contração pode causar desunião na interface dente-restauração, levando ao desenvolvimento de microinfiltração marginal, desadaptação marginal e, conseqüentemente, cáries secundárias, o que ocasiona falhas no tratamento restaurador.

Em 2010, Klautau et al. avaliaram a habilidade de selamento de cavidades dos seguintes compósitos: Aelite/Bisco; Filtek Z350/3M ESPE; Filtek Z350 Flow/3M ESPE; Premise/Kerr e Filtek P90/3M ESPE. Foram utilizados 100 dentes bovinos extraídos, onde cavidades de 5 mm X 2,5 mm foram preparadas, sendo esses dentes divididos então em 5 grupos. Os espécimes dos grupos de 1 a 4 foram todos condicionados com ácido fosfórico, lavados, secados e submetidos ao adesivo Adper Single Bond/ 3M ESPE, diferindo-se apenas pelo compósito utilizado para restaurar. No G1, usou-se Aelite; no G2, Z350; no G3, Z350 Flow e no G4, Premise. Já no grupo 5 foi utilizado o adesivo autocondicionante do silorano + Filtek P90/ 3M ESPE. Em seguida todos os espécimes foram imersos em solução de fucsina básica a 0,5% por 1 s, removidos, lavados imediatamente e observados ao estereomicroscópio. As imagens obtidas foram então transferidas para um computador e o perímetro total e extensão de profundidade do corante foi mensurada. A profundidade de

penetração do corante também foi obtida, por meio do seccionamento transversal dos espécimes e análise ao estereomicroscópio. Concluiu-se que não houve diferenças estatisticamente significantes para a extensão de penetração do corante nas margens da cavidade, e para a profundidade de penetração do corante entre os 5 compósitos testados, mostrando assim que compósitos com menor contração não produzem necessariamente melhor adaptação marginal.

Em 2010, D'Alpino et al. investigaram a influência da quantidade de energia empregada na dureza Knoop, profundidade de polimerização e formação interna de "gaps" de restaurações de classe II, confeccionadas com Filtek P60/ 3M ESPE e Filtek P90/ 3M ESPE. Foram preparadas cavidades de classe II nas superfícies mesial e distal de molares extraídos, sendo esses dentes divididos em 4 grupos de acordo com o sistema restaurador utilizado, Filtek P90 ou Filtek P60, e a dose de energia aplicada, 20J ou 40J. As cavidades foram então restauradas em apenas 2 incrementos e armazenadas por 24h. Após esse período, os espécimes foram seccionados méso-distalmente e a dureza Knoop mensurada. Posteriormente, as amostras foram secadas com ar e 1% de solução vermelho ácido propileno glicol foi aplicada nas margens internas, por 20 s. As amostras foram então lavadas, secadas e analisadas ao microscópio, obtendo-se imagens digitais. Concluiu-se que a formação interna de "gaps" não é afetada nem pelo sistema restaurador utilizado, nem pela dose de energia aplicada. E que os valores de dureza Knoop são determinados pelo tipo de compósito empregado e dose de energia aplicada. Verificou-se que o compósito de metacrilato apresenta maior valor de dureza Knoop, e que somente o compósito de silorano apresenta aumento na dureza Knoop quando alta dose de energia é aplicada.

A restauração direta com o Sistema Filtek Silorano não requer nenhuma técnica especial. Ela funciona da mesma forma que os sistemas adesivos/resinas compostas convencionais, porém com um fator de melhora substancial. Devido à sua menor sensibilidade à luz ambiente, a Filtek P90 Resina Composta Posterior de Baixa Contração pode ser colocada e modelada sob luz operatória por mais de 9 minutos (Catálogo 3M ESPE). Segundo Duarte Jr. et

al., (2009), o tempo para colocar sucessivas camadas de Silorano não deve ser muito longo. Cinco minutos após a colocação das camadas ocorre uma significativa diminuição na força de adesão e aumento na porcentagem de falhas adesivas. Devido à ausência da camada de inibição pelo oxigênio, a adesão entre sucessivas camadas depende da reatividade do compósito, que diminui com o tempo.

O compósito Filtek Silorano vem com um adesivo próprio autocondicionante de 2 passos, comercializado como Sistema Adesivo Silorano (SSA). Ele é composto por um primer hidrofílico autocondicionante, que assegura adesão à dentina úmida, e um adesivo resinoso hidrofóbico, otimizado para molhar e aderir à resina hidrofóbica de silorano. Esse também é baseado em uma composição química com metacrilatos. Além de ter o monômero hidrofóbico bifuncional, que proporciona adesão a resina hidrofóbica de Silorano, também possui uma base de metacrilato, tornando-o assim compatível com compósitos convencionais de Metacrilato (Van Ende et al., 2009).

Tezvergil-Mutluay et al. (2008) avaliaram, através do teste de cisalhamento, a resistência de adesão entre sucessivas camadas de silorano-silorano e silorano-metacrilato, comparando os resultados com a força de adesão entre sucessivas camadas de metacrilato-metacrilato. Para tal, foram usados os compósitos: Filtek Z250/ 3M ESPE (cor A3,5) e Filtek P90/ 3M ESPE (cor A3), ambos como substrato e material restaurador. Como substrato, a resina Filtek P90 foi usada nos grupos 1 a 6 e a Filtek Z250 no grupo 7, sendo esses substratos confeccionados a partir de um molde de resina acrílica. Os grupos foram então divididos da seguinte forma: G1- silorano aplicado imediatamente em substrato silorano; G2- esperou-se 20 s e G3- esperou-se 5 min. No G4, um compósito de metacrilato foi aderido imediatamente ao substrato silorano sem nenhum adesivo; no G5- usou-se o agente adesivo Adper Scotch Bond Multipurpose e no G6- usou-se o agente adesivo Silorane System Adhesive Bond. O grupo 7 serviu como controle, onde metacrilato foi aderido em metacrilato sem sistema adesivo. Foram confeccionados 12 espécimes de cada grupo, a partir de incrementos de 2mm e imersão em água

destilada por 24h. Após a imersão foi realizado o teste de cisalhamento em uma máquina de ensaios universal, onde uma força de 1mm/min foi aplicada na interface substrato-resina até ocorrer a fratura, sendo essa fratura analisada ao microscópio com aumento de 40X. Concluiu-se que o grupo 7 (metacrilato-metacrilato) apresentou a maior força de adesão, sendo que a força de adesão do grupo 1 (silorano-silorano) foi levemente menor que a do G7. No entanto, com o decorrer do tempo, nos grupos 2 e 3 a força de adesão silorano-silorano diminuiu significativamente. Os espécimes silorano-metacrilato sem agente adesivo ou com adesivo do metacrilato (grupos 4 e 5) mostraram a menor força de adesão de todos os espécimes testados, sendo que o uso do agente adesivo do Silorano aumentou a adesão significativamente.

Estudos têm mostrado que compósitos de silorano apresentam propriedades mecânicas aceitáveis e comparáveis aos compósitos de metacrilato. Segundo Duarte Jr. et al. (2009), a avaliação inicial dessa nova categoria de compósito mostrou que esse material apresenta propriedades mecânicas e físicas aceitáveis.

Em 2009, Ilie et al. compararam as propriedades mecânicas nas escalas nano, micro e macro do compósito de silorano com compósitos convencionais de metacrilato, após imersão em diferentes soluções. Foram utilizados um compósito micro-híbrido a base de silorano (Filtek P90/ 3M ESPE), 4 compósitos micro-híbridos de metacrilato (Esthet X/ Dentsply; Tetric/ Ivoclar; Tetric Ceram HB/ Ivoclar e Tetric Ceram/ Ivoclar) e dois compósitos nano-híbridos de metacrilato (Tetric Evo Ceram/ Ivoclar; Filtek Supreme XT/ 3M ESPE). As propriedades mecânicas dos compósitos foram determinadas nas escalas macro (força flexural e módulo de elasticidade), micro (dureza Vickers, módulo de elasticidade e “creep”) e nano (complexo, armazenamento e diminuição no módulo tão bem quanto tan), após imersão dos espécimes em quatro condições diferentes (24h- água, 4 semanas-água, 4 semanas-saliva, 4 semanas-álcool). Para análise da força flexural e módulo na escala macro, os espécimes foram submetidos a uma carga em uma máquina de ensaios universal (MCE 2000ST, Quicktest Prufpartner GmbH, Germany). Para análise da dureza, módulo e “creep” na escala micro foi utilizado um aparelho de

indentação automática (Fischerscope H100C, Fischer, Germany), onde uma força constante é aplicada aos espécimes. Para análise do complexo, armazenamento e diminuição no módulo na escala nano foram utilizadas imagens varridas das superfícies dos compósitos. Concluiu-se que o compósito de silorano apresenta boas propriedades mecânicas, sendo essas comparáveis às dos compósitos de metacrilato. Esse compósito apresentou também estabilidade dessas propriedades quando imerso nos diferentes solventes utilizados, sendo que, em comparação com os compósitos de metacrilato, ele se mostrou mais confiável quando imerso em solução de álcool. Compósitos nano-híbridos apresentaram maior degradação que os compósitos microhíbridos quando imersos em saliva ou água por quatro semanas, enquanto que o efeito de imersão em álcool dependeu da composição do material, como já explicitado.

Em 2008, Furuse et al. avaliaram a estabilidade de cor e retenção do polimento de quatro compósitos resinosos submetidos a um agente acelerador. Foram confeccionados cinco espécimes a partir de um molde (10mm X 2mm) de cada um dos seguinte compósitos: Filtek P90/ 3M ESPE; Herculite XRV/ SDS/Kerr; Quixfil/ Dentsply e Tetric Evo Ceram/ Ivoclar. Esses espécimes foram polidos com discos Sof-lex (3M ESPE) por 30s e colocados em bacia ultrassônica para remoção dos debris. A cor e o polimento foram então mensurados nos períodos 0, 24, 72, 120, 192 horas antes e depois do contato com o agente acelerador. A análise da cor foi feita por um colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-221, Osaka, Japan) usando como parâmetros grau de luminosidade e escuridão, e a mensuração do polimento feita usando-se um “glossmeter” (Novo Curve, Rhopoint, Bexhill-on-Sea, England), que mediu a intensidade do feixe de luz refletido. Concluiu-se que Filtek P90 apresentou melhor estabilidade de cor em comparação com os outros quatro compósitos, sendo que houve variações na cor e no polimento em todos os compósitos testados.

Wei et al. (2010) avaliaram a expansão higroscópica dos compósitos Filtek P90/ 3M ESPE; Vertise Flow/ Kerr Corporation; GC Kalore/ GC American; GC Grandia Direct Anterior/ GC Dental Products Corp e GC Grandia Direct

Posterior/ GC Dental Products Corp. Foram preparados 25 espécimes, sendo cinco de cada compósito testado. Esses foram levados ao dessecador por 24h e desidratados até que a massa de todos se igualasse e fosse inferior a 0,1mg, sendo essa massa aferida por uma balança. Como grupo controle foram confeccionados dois espécimes “Perspex”, sendo que um foi armazenado no dessecador e, o outro, em água deionizada. Para análise da expansão higroscópica, foram feitas medidas das variações dos diâmetros dos espécimes com um laser de não contato (Measuring Unit LSM-503s and Display Unit LSM-6200, Mitutoyo Corporation, Japan). Inicialmente o diâmetro de cada espécime foi aferido e designado por D1, sendo os espécimes então imersos em água deionizada, e variações em seus diâmetros registradas em diferentes intervalos de tempo. A contração de polimerização dos compósitos também foi medida através do método do disco aderido. Concluiu-se que todos os compósitos investigados apresentaram expansão higroscópica durante o período observado. O compósito de silorano foi o que demonstrou a melhor estabilidade dimensional em meio aquoso.

Além das propriedades mecânicas e físicas, as propriedades biológicas desses novos compósitos a base de silorano também devem ser levadas em consideração. A susceptibilidade de adesão de micro-organismos nos materiais restauradores é extremamente importante para a longevidade das restaurações na cavidade oral e não ocorrência de cáries secundárias, sendo a rugosidade de superfície um dos determinantes para adesão bacteriana.

Em 2008, Buegers et al. compararam em um estudo in vitro a capacidade de adesão das bactérias *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* e *S. oralis* ao compósito de silorano, e a quatro compósitos de metacrilato. Foram confeccionados quinze espécimes a partir de um molde (10,0mm X 2,0mm) de cada um dos seguintes compósitos: Filtek P90/ 3M ESPE; Filtek Z250/ 3M ESPE; Tetric Evo Ceram/ Ivoclar; Quixfil/ Dentsply; Spectrum TPH/ Dentsply. Todos os espécimes foram polidos. A determinação da rugosidade de superfície foi realizada em cinco espécimes de cada material pela máquina (Perthometer), em três regiões diferentes. Para análise do potencial hidrofóbico, os espécimes foram limpos com acetona, secados com ar e

imersos em água deionizada. A hidrofobia foi verificada através de imagens computadorizadas do ângulo de contato formado. Para mensuração da adesão bacteriana, colônias de bactérias foram cultivadas em temperatura e tempo apropriados. Os espécimes foram então colocados em contato com as bactérias e um corante fluorescente foi aplicado. O conjunto foi então levado ao MEV (Microscopia eletrônica de varredura) para análise, sendo que áreas de maior fluorescência são indicativas de maior adesão bacteriana. Verificou-se que todos os compósitos testados apresentaram média rugosidade de superfície, podendo ser classificados então como lisos. O ângulo de contato da resina Filtek P90/ 3M ESPE foi significativamente maior, provavelmente devido à sua maior hidrofobia. Essa resina apresentou também menor fluorescência para *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. gordonii*, mostrando, portanto, menor potencial de adesão bacteriana que os compósitos de metacrilato. Concluiu-se que o compósito de silorano apresenta ótima biocompatibilidade e menor potencial mutagênico.

2.2 Citotoxicidade de materiais restauradores

Efeitos citotóxicos de materiais restauradores em cultura de células são causados principalmente pelos intermediários tóxicos liberados na degradação dos compostos dentais.

Para avaliar amplamente a biocompatibilidade e citotoxicidade de um determinado material, indicando sua possível segurança de aplicação clínica, uma série de testes preliminares *in vitro* são necessários (Costa et al., 2003; Kleinsasser et al., 2004). Estes testes podem determinar a intensidade de liberação de componentes dos materiais em meio aquoso, se esta concentração dos componentes aumenta com o decorrer do tempo, e se tal concentração seria tóxica para células em cultura.

Estudos prévios demonstram que muitos materiais dentários, tais como cimento de ionômero de vidro (Chang et al., 2001), sistemas adesivos (Franz et al., 2009), amálgama (Sjogren et al., 2000), cimentos resinosos (Kong et al., 2009) resinas compostas (Karaoglanoglu et al., 2010) apresentam considerável

efeito citotóxico aos tecidos e células do organismo. Dentre esses efeitos, podem-se citar sensibilidade dentária, efeitos imunológicos locais, reações inflamatórias crônicas, genotoxicidade e apoptose (Volk et al.,2006).

Kong et al. (2009), avaliaram em uma cultura de células pulpares, a citotoxicidade de três cimentos resinosos polimerizados (Panavia F; Super Bond C&B; Chemiace II). Corpos de prova foram fabricados a partir de uma matriz de 5mm X 2mm, seguindo as recomendações dos fabricantes sobre tempo de polimerização. Em seguida, esses espécimes foram armazenados em meio DMEM por 72 horas a 37° C. Os componentes obtidos foram então filtrados e diluídos em meio DMEM sem soro, nas concentrações de 75, 50 e 25%, obtendo-se assim quatro grupos experimentais para cada cimento (G1-100%; G2-75%; G3-50%; G4-25%). As células pulpares humanas foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células/well em placas de 96 wells e colocadas em contato com os espécimes. Em seguida, o teste de MTT foi utilizado para avaliação da atividade metabólica celular. Resultados mostraram que, quanto maior a concentração dos componentes diluídos, maior a citotoxicidade. O cimento Panavia F, nas concentrações de 100 e 75% mostrou ser mais citotóxico que os outros dois materiais, mas em baixas concentrações (50 e 25 %) não houve diferença significativa entre os materiais.

Chen et al. (2003) compararam a citotoxicidade de três adesivos de quarta geração (Single Bond- SB; Syntac Sprint- SP e Prime & Bond- PB) em cultura de células pulpares humanas. Os adesivos foram diluídos em 1:1000, 1:2000 e 1:4000 v/v. A cultura celular foi estabelecida a partir da extração de tecidos pulpares de terceiros molares extraídos. As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 cells/well, e após 24h colocadas em contato com as diferentes concentrações dos adesivos pelos períodos de 12h, 24h e 3 dias, sendo a viabilidade celular determinada pelo teste de MTT. Resultados mostraram que, após 24 horas e 3 dias, em todas as diluições, SB foi mais citotóxico que os outros adesivos. Já em 12 horas, SB foi o mais citotóxico na maior diluição, enquanto na menor diluição SP foi o mais tóxico.

Tang et al. (1999) avaliaram o efeito da camada de oxigênio inibitória e do modo de polimerização na citotoxicidade de adesivos ortodônticos. Culturas de fibroblastos gengivais humanos foram obtidas a partir de excisões cirúrgicas. Sete adesivos resinosos à base de BisGMA foram utilizados: dois fotopolimerizáveis (Lightbond e Transbond); dois de 2 pastas e cura química (Phase II e Concise); e três de líquido e pasta e cura química (System 1+; Rely-a-bond e Unit). Com esses materiais foram confeccionados doze corpos de prova a partir de um molde de 2mm x 8mm. Desses, seis foram lavados com acetona 99% para remoção da camada de oxigênio inibitória, sendo posteriormente todos colocados em contato com a cultura celular. Para avaliação da viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial foi realizado o teste de MTT 1, 3 e 6 dias após o contato dos espécimes com as células. Resultados mostraram que a presença da camada de oxigênio inibitória causou diminuição de 33% na viabilidade celular. Os materiais fotopolimerizáveis e os de duas pastas e cura química demonstraram a mesma citotoxicidade. Já os materiais líquido-pasta de cura química demonstraram ser mais citotóxicos que os demais, com viabilidade celular de apenas 37%.

Issa et al. (2008) avaliaram quais concentrações de íons metálicos são citotóxicas para as células humanas oligodendrócitos M03.13 e para fibroblastos gengivais HGF. Íons (Cd^{2+} ; Hg^{2+} ; Au^{3+} ; Cu^{2+} ; Co^{2+} ; Ni^{2+} ; Cr^{2+}) foram preparados e diluídos em água destilada e deionizada, obtendo-se assim várias concentrações. Logo após a preparação, eles foram colocados em contato com as células previamente cultivadas e plaqueadas, sendo a viabilidade celular mensurada por meio do teste de MTT. Resultados mostraram que íons metálicos são citotóxicos para os dois tipos celulares, sendo essa citotoxicidade dependente da concentração do íon. As células M03.13 se mostraram mais sensíveis ao teste que HGFs. Entre os íons, Cd^{2+} foi o mais citotóxico para as células M03.13, enquanto Hg^{2+} foi o mais citotóxico para HGFs.

Chang et al. (2001) avaliaram os efeitos citotóxicos do flúor liberado dos cimentos ionoméricos sobre uma cultura de células pulpares humanas. Fluoreto de sódio foi dissolvido em meio de cultura DMEM, até a obtenção de

uma concentração final de F^- de 0 a 10mmol/l. Em seguida, diferentes concentrações de flúor foram colocadas em contato com as células pulpares previamente cultivadas e obtidas a partir de pré-molares extraídos. Por meio de diferentes determinantes, foram utilizados quatro testes para mensuração da viabilidade celular: avaliação do dano ao DNA- H33258 fluorescência; avaliação da atividade mitocondrial- MTT; avaliação da síntese de proteínas e avaliação da proliferação celular. Resultados mostraram que, em todos os testes, o flúor se mostrou citotóxico para as células pulpares, inibindo o crescimento e a proliferação celular, assim como a síntese de proteínas e a atividade mitocondrial, Sendo a citotoxicidade diretamente dependente da concentração do flúor e do tempo de contato.

As matrizes orgânicas dos compósitos resinosos são expostas ao meio oral, quando da realização da restauração. Isso ocasiona liberação de monômeros residuais e de outros componentes não polimerizados. Segundo Karaoglanoglu et al. (2010), após a polimerização, monômeros não reagidos e aditivos são extraídos por solventes como a saliva e/ou solventes da dieta, especialmente nas primeiras 24 horas, resultando em diminuição das propriedades mecânicas dos compósitos e até reações alérgicas em pacientes.

Muitas pesquisas têm demonstrado que a conversão de monômeros em polímeros, seja ela ativada quimicamente ou pela aplicação da luz visível, está diretamente relacionada com os efeitos citotóxicos de um determinado material como um todo (Lewis et al., 1996; Nalçaci et al., 2004). Estudos têm demonstrado que a reação de conversão dos monômeros em polímeros não ocorre de maneira eficiente, resultando na presença de moléculas de baixo peso molecular ou radicais livres que são gerados durante o processo de fotoativação (Ferracane e Condon, 1990). Muitos fatores, tais como presença de oxigênio e água (Paul et al., 1999), podem interferir com a adequada polimerização do material restaurador (Costa et al., 2003). Assim, monômeros residuais livres parecem estar presentes em todos materiais resinosos, sendo sua quantidade diretamente relacionada com o conteúdo de oxigênio local e presença de umidade da estrutura dentária.

Devido à severa citotoxicidade dos compósitos a base de metacrilato, indústrias estão desenvolvendo novos materiais e novas estratégias. Estudos prévios demonstram que monômeros como BisGMA podem suprimir a síntese de proteínas e induzir morte celular (Hanks et al., 1991). Foi verificado por Chen et al. (2003), que o monômero de BisGMA é o que apresenta maior citotoxicidade, seguido sequencialmente pelos monômeros UDMA, TEGDMA e HEMA.

Karaoglanoglu et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade de sete materiais resinosos restauradores: dois cimentos ionoméricos (Ionofil U; Ketac Molar e Easymix); um compômero (Dyract); três resinas compostas (Valux plus; Alert e Filtek P60) e um ormocer (Admira), todos na cor A2. Foram preparados 21 espécimes de cada material a partir de um molde de 4mmx 2mm. Para confecção dos espécimes, os materiais foram inseridos no molde e fotopolimerizados por ambos os lados com o dispositivo de luz halógena (Elipar Freelight II/ 3M ESPE). Em seguida, os corpos de prova foram divididos em três grupos, de acordo com o tempo de armazenamento em meio DMEM (G1- 24h; G2- 48h; G3- 10 dias). Os extratos resultantes do armazenamento dos espécimes foram então colocados em contato com fibroblastos de ratos, e a viabilidade celular mensurada por meio do teste de MTT, que mede a atividade da enzima mitocondrial succinase desidrogenase. Os resultados mostraram que após 24h todos os materiais testados, exceto as resinas Alert e Filtek P60, foram citotóxicos. Após 48h os cimentos ionoméricos demonstraram a maior citotoxicidade entre os outros testados, e ao final de 10 dias nenhum material demonstrou ser citotóxico.

Volk et al. (2006) analisaram os efeitos citotóxicos dos monômeros HEMA; TEGDMA e UDMA sobre o metabolismo GSH de fibroblastos gengivais humanos. Fibroblastos gengivais humanos foram obtidos de biópsias de gengivas saudáveis e cultivados em meio DMEM até atingirem a confluência. Entre a quinta e nona passagem, essas células foram plaqueadas e colocadas em contato, por quatro horas, com diversas concentrações dos monômeros previamente preparados em DMSO e diluídos em meio DMEM (HEMA: 0,1-10mM; TEGDMA: 0,05- 2.5mM e UDMA 0,005- 0.25mM). Para determinação

do metabolismo GSH, foi usado o teste com monobromobimane (MBBr), no qual esse reagente se liga ao GSH e é detectado por fluorescência. Resultados mostraram que todos os monômeros provocaram diminuição na concentração de GSH, sendo o potencial de redução a 50% de GSH maior para UDMA>TEGDMA>HEMA. Nenhum dos monômeros causou redução significativa do número de células durante as quatro horas de tratamento. No entanto, o monômero UDMA na concentração de 0,25mM e em concentrações maiores provocou uma redução significativa do número celular.

Sigusch et al. (2007) avaliaram se existe relação entre a citotoxicidade de compósitos resinosos e a fonte de luz empregada na fotopolimerização desses. Foram confeccionados corpos de prova a partir de um molde de 2mm x 4mm com os seguintes compósitos: Filtek Z250/ 3M ESPE; Durafill VS/ Heraeus Kulzer; Grandio/ Voco; e Solitaire 2/ Heraeus Kulzer, utilizando três dispositivos de luz: Heliolux II- 40s; LED- 40s; e Swiss Master Light- 4s. Para cada combinação de compósito-fonte de luz foram confeccionados cinco espécimes, que posteriormente foram armazenados em placas de 96 “wells” com meio de cultura, no escuro, a 37°C. Os extratos resultantes dos compósitos foram recolhidos em tubos separados no 1º, 7º, 14º, 21º, e 28º dias e armazenados a – 20°C até serem usados sendo que, após a remoção do meio com os extratos nos determinados dias, os “wells” eram lavados com PBS e novo meio era adicionado. Em seguida, os extratos resultantes dos compósitos foram colocados em contato com fibroblastos gengivais previamente cultivados, sendo a viabilidade celular mensurada por meio do teste de MTT. Resultados mostraram que os dispositivos de baixa intensidade LED e Heliolux II apresentaram características semelhantes para todos os quatro compósitos, em relação à taxa de viabilidade celular. Após 1 dia de armazenamento, resultados sub-ótimos puderam ser observados para a combinação SML/ Durafill e resultados ótimos para SML/ Grandio (aproximadamente 100% de viabilidade celular). Para o compósito Solitaire, o dispositivo SML gerou resultados significativamente melhores que os outros (LCUs viabilidade celular, $p \leq 0,001$: SML 60,5%, 44,5% Heliolux, LED 44,2%). Além disso, a combinação de SML com o compósito Z 250 mostrou, após o

primeiro dia e até o dia 28, taxas de viabilidade celular estatisticamente maiores do que a combinação com o LED ou Heliolux II.

Em 2012, o mesmo grupo de Sigusch et al., investigou se a cor de uma resina e a fonte de luz empregada para sua confecção influenciam na citotoxicidade dos compósitos. Foram utilizadas duas unidades de luz (Heliolux II- por 40s HLX; e Swiss master light- por 4s SML), para polimerizar três compósitos nas cores A2 e C2 (Filtek Z250; Solitaire e Grandio). Para cada compósito, foram confeccionados a partir de um molde de 2mm x 4mm cinco espécimes para cada unidade de luz empregada e cinco espécimes não polimerizados. Em seguida, esses espécimes foram armazenados em meio de cultura pelos períodos experimentais de 7, 14, 21 e 28 dias. Após esse período, os espécimes foram colocados em contato com fibroblastos gengivais, obtidos de biópsias de gengivas saudáveis, sendo a viabilidade celular determinada pelo teste de MTT. Resultados mostraram que para os espécimes não-polimerizados, a cor não influenciou na citotoxicidade, exceto para o compósito Solitaire, que demonstrou maior citotoxicidade para a cor C2 após 21 dias. Já para os espécimes polimerizados, a citotoxicidade foi maior para todos os espécimes da cor C2 do que os da cor A2. Com relação às unidades de luz utilizadas, quando se empregou a fonte de luz HLX, os espécimes dos compósitos Grandio e Solitaire na cor C2 foram mais tóxicos que os espécimes da cor A2. Já com o uso de SML, o efeito citotóxico diminuiu. O compósito Grandio demonstrou a menor citotoxicidade, independente da fonte de luz empregada e, o compósito Filtek Z250, a maior.

Issa et al., (2004) avaliaram, através dos testes de MTT e LDH, a citotoxicidade sobre fibroblastos gengivais humanos de monômeros resinosos. Cinco monômeros foram utilizados no estudo (HEMA; HPMA; DMAEMA; TEGDMA e BisGMA), sendo todos preparados em DMSO na concentração abaixo de 0,25%. Em seguida, esses monômeros foram colocados em contato com fibroblastos gengivais previamente cultivados e plaqueados em placas de 96 wells. A viabilidade celular foi então mensurada através do teste de MTT para determinação do metabolismo celular, e do teste de LDH para determinação da integridade celular. Resultados mostraram que todos os

monômeros testados inibiram a atividade da enzima mitocondrial (teste de MTT), e aumentaram a liberação de LDH (teste de LDH). A classificação de citotoxicidade dos monômeros foi a seguinte: BisGMA> TEGDMA> DMAEMA> HPMA> HEMA. O teste de MTT foi consideravelmente mais sensível que o teste de LDH.

Testes de citotoxicidade de materiais restauradores são realizados em uma gama de tipos celulares: fibroblastos gengivais, odontoblastos, fibroblastos pulpares, células epiteliais, células imortalizadas de ratos, etc. O uso de fibroblastos gengivais humanos em testes de citotoxicidade ocorre, pois esses estão em proximidade com materiais restauradores na cavidade oral e são clinicamente mais relevantes. Além disso, esse tipo celular é mais sensível e pode ser facilmente isolado e cultivado em meio de cultura normal (Moharamzadeh et al., 2007).

Ergun et al. (2011) compararam a eficácia de três fontes de luz (LED, PAC e luz halógena de alta potência-QTH), na citotoxicidade de cinco compósitos resinosos (Clearfil AP-X; Simile; Grandio Caps; Filtek Z250 e Aelite Aesthetic Enamel) irradiados a duas diferentes distâncias. Para o estudo culturas de fibroblastos de ratos L-929 foram obtidas e utilizadas na terceira passagem. Os espécimes testados foram preparados a partir de um molde circular de 2mm x 6mm. Os compósitos foram inseridos no molde e fotopolimerizados a 2 ou a 9 mm de distância utilizando um dos três dispositivos de luz: QTH por 20 segundos; LED por 20 segundos; ou PAC por 6 segundos. Em seguida, os espécimes foram armazenados em meio DMEM e incubados em estufa por 24h ou 72h, sendo a viabilidade celular verificada através do teste de MTT a partir dos componentes liberados no meio. Resultados mostraram que os diferentes parâmetros testados (tipo de resina composta; unidade de luz utilizada; distância de polimerização e período de incubação) têm efeito citotóxico estatisticamente diferente e significativo. No entanto, quando os compósitos foram polimerizados por ambas as distâncias (2 e 9 mm), em ambos os períodos de avaliação (24 e 72h), não houveram diferenças estatisticamente significantes na citotoxicidade quando QTH, LED e PAC foram utilizados.

Moharamzadeh et al. (2007) avaliaram e compararam os efeitos biológicos de três monômeros resinosos (TEGDMA, UDMA e Bis-GMA) em três linhagens diferentes de fibroblastos gengivais e em queratinócitos HaCat. Fibroblastos foram obtidos a partir de biópsias de pacientes e utilizados na sexta passagem, os queratinócitos eram células imortalizadas e doadas. Monômeros foram dissolvidos em DMSO e diluídos em meio de cultura DMEM em sete concentrações diferentes. Em seguida, eles foram colocados em contato por 24h com as células já plaqueadas na concentração de 5×10^4 células/well. A citotoxicidade foi então mensurada através do teste de Alamar Blue, e os marcadores inflamatórios IL-1B detectados pelo teste de Elisa. Resultados mostraram que todos os monômeros resinosos são tóxicos aos fibroblastos gengivais e queratinócitos, independente da linhagem, sendo BisGMA o monômero mais tóxico e UDMA o menos tóxico. Não foi encontrada indução de liberação de IL-1B.

Annunziata et al.(2006) investigaram se as propriedades biológicas de compósitos fotoativados são afetadas quando esses são usados como sistema adesivo para cimentação de “inlays”. Foi utilizado o compósito Filtek Supreme (3M ESPE), tanto como agente cimentante, quanto para confecção de “inlays”. As restaurações “inlays” foram confeccionadas a partir de um molde de 2mm x 7mm, onde o compósito foi inserido nele e polimerizado por 120 segundos, por ambos os lados, para obtenção do restaurado. Em seguida, espécimes do compósito foram confeccionados na dimensão de 1mm x 7mm em duas diferentes situações, formando-se assim dois grupos: primeiro com o restaurado “inlay” interpondo entre o espécime e a fonte de luz (G1) ; e depois sem a interposição do restaurado “inlay” (G2). Os espécimes foram então armazenados em meio DMEM-F12 e incubados a 37°C por 24h. Após esse período, os extratos foram filtrados e colocados em contato com fibroblastos pulpares e gengivais previamente cultivados, sendo a viabilidade celular mensurada pelo teste de MTT. Resultados mostraram que tanto espécimes do grupo 1, quanto espécimes do grupo 2 foram citotóxicos para as células pulpares e gengivais, sendo que a presença da “inlay” no G1 causou um aumento significativo da citotoxicidade quando comparado com G2.

2.3 Grau de conversão de compósitos

O grau de conversão dos monômeros influencia a estabilidade química dos compósitos. Portanto, é importante sabermos que grau de conversão é uma medida do percentual de duplas ligações de carbono que foram convertidas em ligações simples de carbono para formar uma cadeia polimérica (Knezevic et al., 2005). Assim, ligações duplas de carbono não convertidas podem tornar os materiais mais susceptíveis a reações de degradação, o que resulta em instabilidade de cor, diminuição das propriedades físicas e liberação de subprodutos citotóxicos. Segundo Ergun et al., 2011, tanto a composição de uma resina composta quanto a porcentagem de conversão dos monômeros são considerados como causa potencial de citotoxicidade.

Franz et al., (2009), em um estudo *in vitro*, desenvolveram um protocolo clínico simulando o ambiente da cavidade oral para analisar a influência dos adesivos dentais na citotoxicidade de seis compósitos resinosos. Também analisaram a influência da camada de oxigênio inibitória no grau de conversão (DC) dos sistemas adesivos. Foram preparados espécimes cilíndricos dos compósitos testados a partir de um molde de 5mm x 2mm. Para um grupo o compósito foi inserido no molde e fotopolimerizado por um dos lados por 40 s, já para o outro grupo, inicialmente, foi aplicado e fotopolimerizado o adesivo dentro do molde, seguido pela aplicação do compósito e fotopolimerização por 40s por um dos lados. Os espécimes confeccionados foram então esterelizados com radiação UV e colocados imediatamente ou após sete dias de pré-incubação em meio DMEM, em contato com fibroblastos L929 por 72h. Espécimes cilíndricos de vidro foram usados como grupo controle. Após a incubação, as células foram então submetidas ao teste de Citometria de Fluxo para determinação do número de células sobreviventes, através de comparação com o grupo controle. Para mensuração do grau de conversão foi utilizado o teste de FTIR, a partir da análise de finas camadas de sistema adesivo fotopolimerizadas em condições aeróbicas e anaeróbicas. Concluiu-se que os sistemas adesivos não têm influência significativa na citotoxicidade dos compósitos. E que todos os compósitos recém-preparados e colocados imediatamente em contato com as células se mostraram mais citotóxicos do

que aqueles pré-incubados por sete dias. Com relação ao grau de conversão, esse diminuiu quando da presença da camada de oxigênio inibitória.

Para se avaliar a eficiência de ativação das resinas compostas e seu consequente grau de conversão, estudos têm utilizado diferentes parâmetros e metodologias. Pianelli et al., (1999) e Leloup et al., (2002) afirmam que os quatro tipos de testes mais usualmente relatados na literatura seriam a avaliação da microdureza, microscopia óptica, “*scraping test*” e metodologias vibracionais através de espectroscopia infravermelha (FTIR- Transformada Fourier infra-vermelha) e Raman (FT-Raman). Desde que a posição das bandas Raman seja específica para um determinado grupo químico, a espectroscopia FTIR pode ser usada para identificação e quantificação (Gauthier et al., 2005). Essa permite a avaliação do grau de conversão para resinas do tipo metacrilato e silorano através da comparação das bandas vibracionais. Para as resinas de metacrilato, as bandas de interesse situam-se em 1635 cm^{-1} (C=C alifática) e 1608 cm^{-1} (C=C aromática), já para as resinas de silorano em 883 cm^{-1} (C-O-C) e 1608 cm^{-1} (C=C aromática). A partir desse método, é possível avaliar o grau de conversão dos compósitos, e sua relação com diversas propriedades físicas, mecânicas e biológicas.

Silikas et al., (2000) investigaram a relação entre o grau de conversão (DC) e a força de contração de dois compósitos (Filtek Z100/ 3M ESPE, e Tetric Ceram/ Ivoclar), quando esses foram irradiados por dois níveis de intensidade de luz, por diferentes períodos de tempo. Espécimes desses compósitos foram confeccionados em quatro diferentes modos: Modo 1= 40 s a 750 mW/cm^2 ; Modo 2= 10 s a 200 Mw/cm^2 seguido por 30 s a 750 mW/cm^2 ; Modo 3= 40 s a 200 Mw/cm^2 ; Modo 4= 10 s a 200 mW/cm^2 . Para cálculo do grau de conversão, utilizou-se FTIR, onde um espectro foi obtido dos compósitos polimerizados e não polimerizados, e DC calculado em porcentagem a partir do compósito não polimerizado. Para mensuração da força de contração, utilizou-se a técnica do disco aderido, onde mensurações foram realizadas continuamente por 30m, a partir do início da fotoativação. Concluiu-se que não houve diferença no grau de conversão entre os compósitos quando se utilizou os modos 1 e 2, entretanto diferenças

significativas foram encontradas entre os modos 3 e 4. Com relação à força de contração avaliada após 30 m, não houveram diferenças significativas quando se utilizou os modos 1 e 2, no entanto nos modos 3 e 4 observou-se uma redução na contração. Para todos os compósitos testados obteve-se uma relação linear entre DC e força de contração.

Mundim et al., (2011) investigaram se existe relação entre a temperatura do compósito (Tetric N-Ceram/ Ivoclar Vivadent, cor A3) , seu grau de conversão e suas propriedades ópticas (estabilidade de cor e opacidade). Para o estudo, o compósito foi previamente armazenado em três temperaturas 8, 25 e 60°C. Em seguida, foram confeccionados nove corpos de prova para cada temperatura, a partir de um molde de 12mm x 2mm. Desses, seis foram usados para análise de cor e três para avaliação do grau de conversão. Para análise da cor e opacidade, foi utilizado um espectrômetro, onde variações nessas propriedades foram avaliadas pela diferença encontrada antes e após imersão dos corpos de prova em um corante. Para mensuração do grau de conversão foi utilizado o método de FTIR, onde espectros foram obtidos do composto polimerizado e do não polimerizado (referência). Os resultados foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey. Concluiu-se que não existe diferença na estabilidade de cor e opacidade do compósito quando foram empregadas as três temperaturas diferentes. Com relação ao grau de conversão, verificou-se que o grupo que foi pré-aquecido a 60°C exibiu maior grau de conversão que os outros grupos.

O grau de conversão de um compósito é discutido juntamente com a variedade de fatores que modificam o processo de fotoativação, como a composição da resina que influencia na transmissão de luz através do material, na concentração do fotoiniciador, iniciador e inibidor presente (Stansbury, 2000; Anusavice, 2003; Soares et al., 2003). Alguns trabalhos ainda deixam evidente que uma alta concentração de fotoiniciadores melhora o grau de conversão e as propriedades mecânicas na formação dos polímeros (Peutzfelt & Asmussen, 1989; Schroeder & Vallo, 2007; Schneider et al., 2008). Assim como cada compósito apresenta uma constituição diferente, é esperado comportamento

diferente tanto para as resinas a base de silorano quanto para aquelas ditas convencionais.

Em 2009, Papadogiannis et al. também avaliaram a força de contração de polimerização de compósitos resinosos disponíveis comercialmente: Clearfil Majesty; Ceram-X Mono; Els; Filtek Silorano e Premise. Investigou-se também se essa força exibe uma possível interação com o grau de conversão e a adaptação marginal. Para tal, utilizou-se do método do disco aderido para cálculo da força de contração; o grau de conversão foi mensurado por meio de FTIR; e a adaptação marginal foi analisada ao microscópio. Os resultados mostraram que os compósitos de silorano e Clearfil Majesty apresentaram a menor força de contração entre todos os compósitos testados, sendo do Silorano a menor força. Não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre grau de conversão e força de contração, ao contrário da adaptação marginal que apresentou forte relação.

Palin et al., (2004) investigaram a relação entre grau de conversão, deflexão de cúspides e microinfiltração de duas resinas a base de metacrilato (Filtek Z100/ 3M ESPE e Filtek Z250/ 3M ESPE), uma a base de oxirano (EXL 596) e uma a base de silorano (Filtek Silorano/ 3M ESPE). Cavidades MOD foram preparadas em pré-molares extraídos e restauradas com os compósitos testados. Para mensuração da deflexão de cúspides, utilizou-se de um aparelho (DCDT) por 0,1 horas até cessar a irradiação de luz. O grau de conversão foi medido por FTIR e a microinfiltração mensurada por análise dos espécimes ao microscópio, após imersão em fucsina 0,2% e 500 termociclos. Os resultados mostraram que compósitos a base de silorano e oxirano apresentaram menor deflexão de cúspides que os compósitos de metacrilato. A microinfiltração do compósito de silorano foi menor que a do compósito Z250 e EXL596. O grau de conversão dos compósitos a base de silorano e oxirano diminuiu significativamente em comparação com os compósitos de metacrilato.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o grau de conversão e o efeito citotóxico, sobre cultura primária de fibroblastos gengivais, de diferentes resinas compostas empregadas em Odontologia Restauradora. Analisar, também, se existe correlação entre a viabilidade celular e o grau de conversão desses materiais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Mensurar a viabilidade celular de fibroblastos gengivais após o contato indireto com compósitos fotopolimerizados por dois tempos (20 e 40s) e armazenados por 24 horas ou 12 dias antes do experimento, por meio do teste de MTT.
2. Comparar o grau de conversão dos compósitos testados e fotopolimerizados por dois tempos (20 e 40s) por meio do teste de FTIR.
3. Correlacionar o grau de conversão dos compósitos testados e fotopolimerizados por dois tempos (20 e 40s) com a viabilidade celular.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos e legais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), sob o parecer número 570/11 (APÊNDICE 1), obedecendo às exigências da legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

4.2 Seleção dos casos

Indivíduos de ambos os sexos, na faixa etária entre 18 e 35 anos, sem alterações sistêmicas que comprometessem sua saúde e que possuíssem necessidade de remoção de tecido gengival por razões estéticas ou funcionais, foram selecionados para o estudo. Voluntários que se encontravam em tratamento nos cursos de extensão em Cirurgia e Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG participaram do estudo. No entanto, foi utilizado o tecido gengival de apenas um voluntário, uma vez que se obteve sucesso no primeiro procedimento de extração, e essas células foram suficientes para realização de todos os testes.

4.3 Extração dos fibroblastos gengivais

Imediatamente após a cirurgia realizada nas clínicas de Cirurgia e Periodontia da Faculdade de Odontologia UFMG, o tecido gengival foi colocado num frasco contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO/Invitrogen, Grand Island, NY, USA), 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e 0,2% de anfotericina B. Em seguida, o frasco contendo o tecido gengival foi transportado para o Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais, Instituto de Ciências Exatas/Química, UFMG.

O tecido gengival foi então submetido aos procedimentos de extração dos fibroblastos gengivais em câmara de fluxo laminar, sob condições estéreis.

Para a extração celular, o tecido gengival foi limpo com uma solução tampão de PBS para remoção das células sanguíneas. Posteriormente, numa placa de Petri contendo meio base, esse foi fragmentado com uma lâmina de bisturi n° 15. Os fragmentos foram então depositados num falcon estéril de 15 ml contendo 1 ml de solução composta por 4ml de meio base + 4 mg/ml de dispase e 3 mg/ml de colagenase tipo I (ambas da GIBCO/*Invitrogen*) e incubados a 37°C, por 60 minutos. Esse procedimento foi repetido quatro vezes. A solução foi então centrifugada a 1400 rpm por dez minutos, sendo em seguida descartado o sobrenadante, preservando-se apenas o *pellet* de células. O *pellet* foi ressuspendido em meio DMEM completo, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e 0,2% de anfotericina B. As células foram cultivadas em culturas de monocamadas em incubadora umidificada na temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar. Trocas do meio de cultura foram realizadas a cada dois ou três dias. Quando as células se tornaram confluentes, foram colhidas com solução tripsina-EDTA 0,5% e transferidas para subculturas. Estes procedimentos foram repetidos até que se obtivesse o número adequado de células para execução do experimento.

4.4 Confeção dos corpos de prova

Neste estudo, foram avaliadas quatro resinas compostas, todas na cor A2, com indicação para confecção de restaurações diretas, sendo três delas a base de Metacrilato e uma a base de Silorano (Fig.2).



Fig. 2 Resinas compostas avaliadas na cor A2

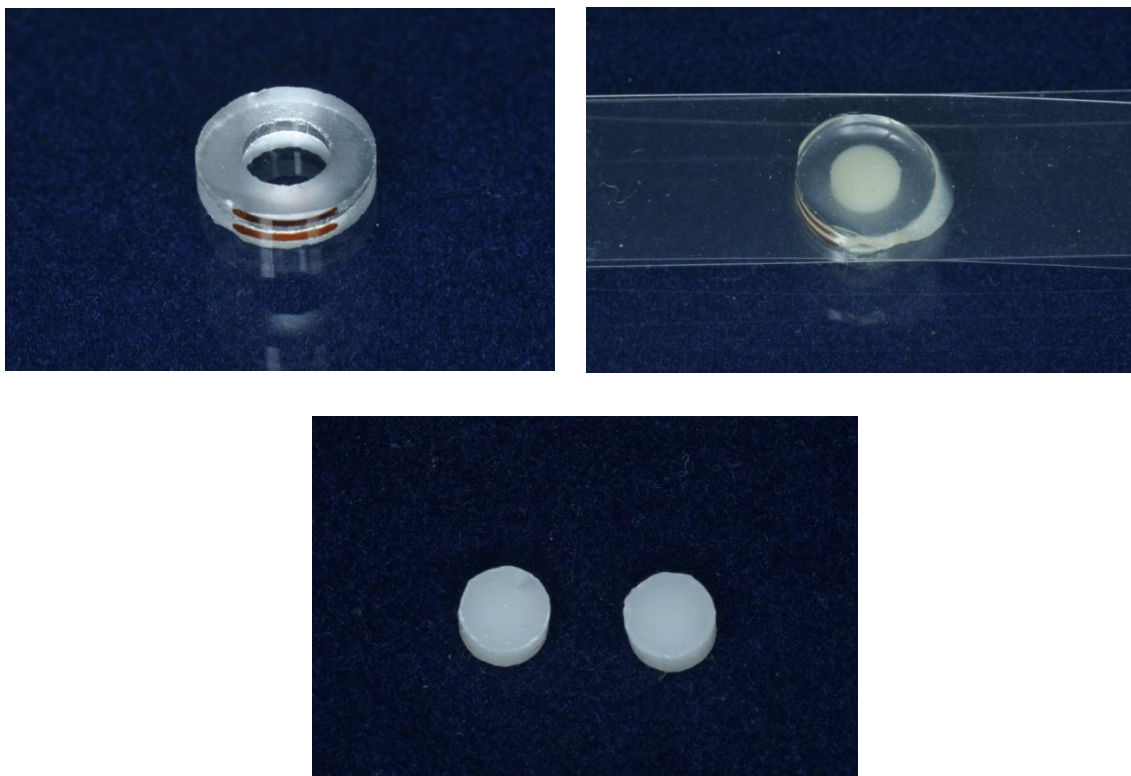
A composição de cada um dos materiais experimentais, percentual de carga inorgânica, e respectivos fabricantes, estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Resinas compostas utilizadas

Marca comercial	Fabricante	Matriz resinosa	Percentual de carga inorgânica
Filtek P90	3M ESPE	Silorano	76%
Filtek Z350XT	3M ESPE	BIS-GMA, BIS-EMA, UDMA, TEGDMA, PEGDMA	78,5%
Filtek Z100	3M ESPE	BIS-GMA, TEGDMA	71%
Filtek Z250	3M ESPE	BIS-GMA, BIS-EMA, UDMA	60%

Seis corpos-de-prova de cada material experimental foram confeccionados a partir de uma matriz de vidro nas dimensões de 2mm de espessura por 4mm de diâmetro (Figuras 3,4 e 5). Sobre uma placa de vidro, as resinas foram inseridas na matriz com espátulas próprias, comprimidas com tiras de poliéster e imediatamente fotopolimerizadas utilizando um dispositivo de LED (FLASH lite, DISCULS DENTAL, Culver City, USA), encostado diretamente na tira de poliéster pelos períodos de 20 ou 40 segundos. A intensidade de luz emitida pelo aparelho fotoativador ($570\text{-}600\text{mW/cm}^2$) foi monitorada durante todo o experimento por meio de um radiômetro (MODEL 100 Curing Radiometer, Demetron/Kerr, Danbury, CT, USA).(Fig.6)

Após a fotopolimerização, os espécimes foram removidos da matriz por extrusão, marcados com uma lâmina de bisturi do lado que sofreram diretamente a fotopolimerização e imediatamente protegidos da luz em recipientes escuros. Em seguida, esses espécimes passaram por um ciclo de esterilização com óxido de etileno antes da realização dos testes.



Figs.3, 4 e 5 Confeção dos corpos de prova



Fig. 6 Dispositivo de LED e radiômetro utilizados

Placas de cultura estéreis com 24 compartimentos individualizados (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) foram utilizadas neste experimento. Em todos os compartimentos, foi aplicado 1,0 mL de meio de cultura não suplementado com soro fetal bovino (MC-SFB), uma vez que investigações prévias (Takeda et al., 1993) afirmaram que componentes liberados de materiais resinosos podem interagir com constituintes do SFB, interferindo, assim, nos resultados de pesquisas de citotoxicidade em cultura de células.

Com o auxílio de uma pinça clínica estéril, os corpos-de-prova já esterilizados, foram posicionados com o lado que não sofreu diretamente a polimerização, na base dos compartimentos dos pratos de acrílico que continham 1,0mL do meio de cultura desprovido de SFB (MC-SFB). Finalmente, estes pratos de acrílico com os materiais experimentais (corpos-de-prova) imersos em MC-SFB foram colocados em incubadora, na temperatura de 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar, onde permaneceram pelos períodos experimentais de 24 horas ou 12 dias (Fig.7). Para o grupo controle, o

meio de cultura sem soro fetal bovino também permaneceu em incubação pelos períodos de 24 horas ou 12 dias, sendo que após esses períodos, esse meio foi aplicado sobre as células previamente cultivadas experimentais.

A relação entre os grupos experimentais e controle, de acordo com os períodos de avaliação e número de espécimes, estão demonstrados na tabela 2.



Fig 7. Pratos de acrílico com corpos de prova imersos em meio de cultura

Tabela 2: Relação entre grupos experimentais de acordo com os períodos de avaliação e o número de espécimes.

GRUPOS	FILTEK P90	FILTEK Z250	FILTEK Z350XT	FILTEK Z100	Controle	TOTAL
PERÍODOS						
24 horas	6	6	6	6	6	30
12 dias	6	6	6	6	6	30
Total	12	12	12	12	12	60

4.5 Cultivo das células e avaliação do metabolismo celular

Alíquotas de $1,5 \times 10^5$ células/poço em 0,1 ml de meio foram semeadas em *sextuplicata* em microplacas de 96-poços por 72 horas em incubadora umidificada na temperatura de 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. A contagem celular foi realizada utilizando o teste de exclusão com azul de Tripán em câmara de Neubauer. Logo após o tempo de incubação, o meio de cultura em contato com as células foi cuidadosamente aspirado, e substituído por 0,1mL da solução que havia permanecido em contato com os corpos-de-prova pelos períodos de 24 horas ou 12 dias. As placas contendo as soluções experimentais foram levemente agitadas, para homogeneização, antes de serem alteradas. Estas soluções experimentais, compostas por MC-SFB e possivelmente componentes solúveis em meio aquoso dos materiais em estudo, permaneceram em contato com as células pelo tempo de 24 horas em incubadora.

Os seis espécimes de cada grupo experimental e controle foram utilizados para a avaliação do metabolismo celular. Esta avaliação foi realizada através da aplicação da técnica do sal de metiltetrazolium (MTT assay), o que determina a atividade da enzima desidrogenase succínica produzida pelas mitocôndrias. O ensaio de sal de tetrazólio - MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide*) (*Invitrogen/Vybrant MTT, Molecular Probes, Eugene, OR, USA*) - é um teste colorimétrico que possui o objetivo de medir a atividade mitocondrial das células. Este teste envolve a redução de um substrato incolor, MTT, num produto insolúvel com coloração azul escura, cristais de formazan, os quais são formados proporcionalmente à atividade de succinato desidrogenase nas mitocôndrias de células viáveis.

O ensaio de MTT foi realizado 24 horas após o contato das células com as soluções experimentais. Previamente as soluções testadas foram cuidadosamente aspiradas, e as células lavadas delicadamente com PBS. Em seguida as células foram supridas com meio base e 10 µl de MTT (5 mg/ml) foram depositados nas mesmas. As placas foram então incubadas por 4 h a 37°C em atmosfera umidificada de CO₂ 5% e ar 95%. Decorrido este período, as placas de cultura foram retiradas da incubadora, sendo que a mistura do meio de cultura com a solução do sal de metiltetrazolium foi aspirada cuidadosamente. Após completa aspiração da solução, os cristais formados

pela degradação dos anéis do sal de metiltetrazolium puderam ser observados ao microscópio invertido de luz (BEL Photonics®, BEL Equipamentos Ltda, Piracicaba, SP) aderidos ao fundo de cada compartimento individualizado. Numa segunda etapa, 100 µl de 10% SDSHCl (Dodecil sulfato de sódio - ácido clorídrico) foi acrescentado nos grupos para solubilização dos cristais e as placas foram novamente incubadas *overnight* em estufa nas condições previamente descritas. Estes cristais, quando dissolvidos pela presença do isopropanol, resultam em uma solução de coloração roxa de variada intensidade, a qual é quantificada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 570nm.

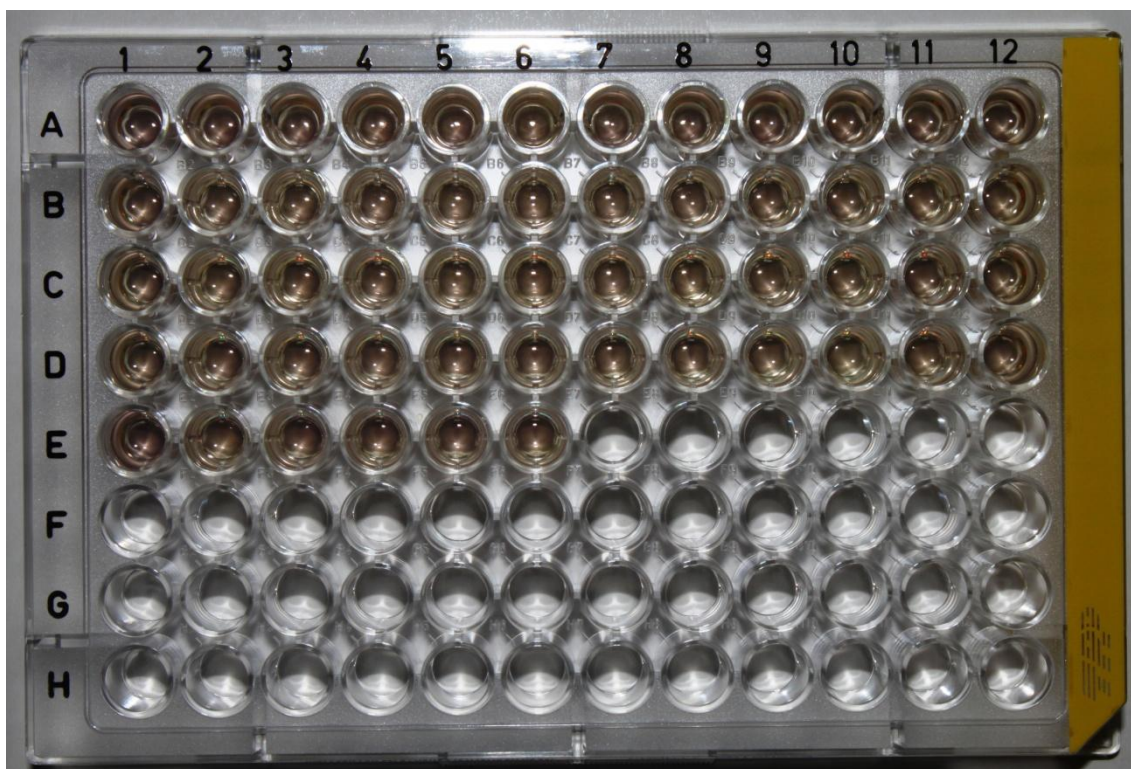


Fig.8 Aspecto colorimétrico da placa de cultura após realização do MTT – 24h

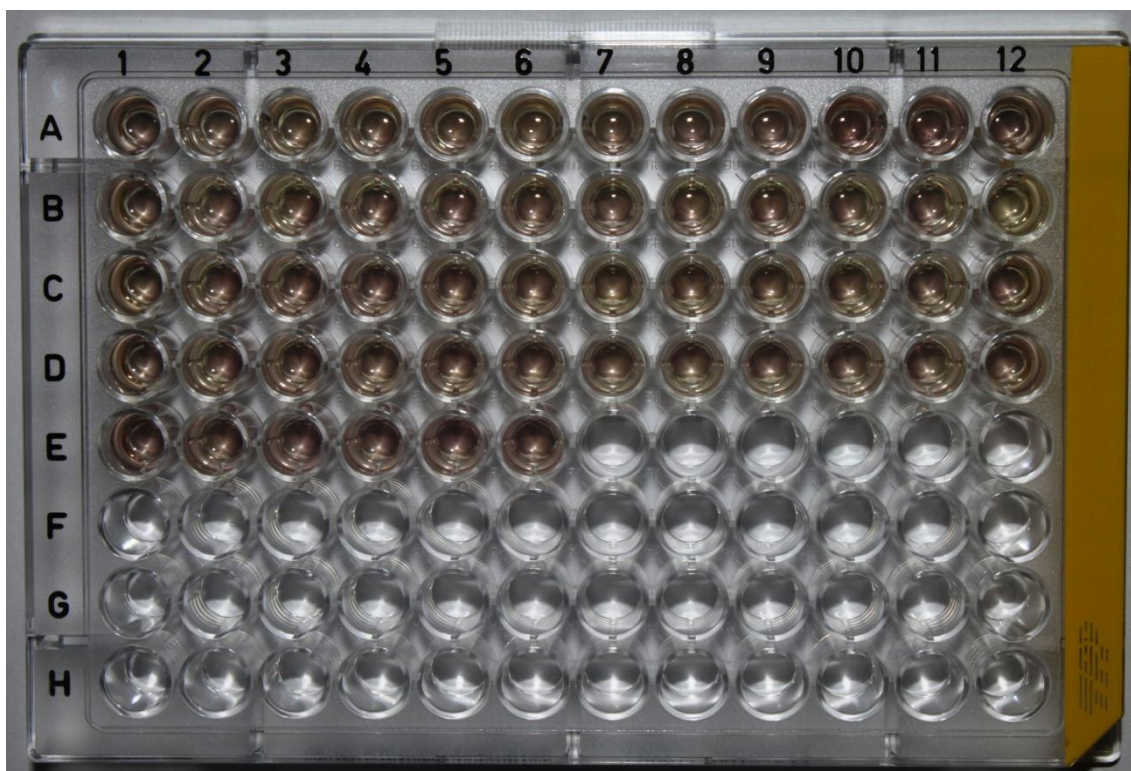


Fig.9 Aspecto colorimétrico da placa de cultura após realização do MTT – 12d

Para a leitura de todas as soluções, as próprias placas de 96 compartimentos foram inseridas no espectrofotômetro. Os dados de metabolismo celular expressos em valores numéricos foram submetidos à análise estatística pelo teste de ANOVA com correção de Bonferroni ($p < 0,05$), com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, CA, USA).

A citotoxicidade celular foi então avaliada de acordo com a porcentagem de viabilidade celular (MTT) em relação ao controle negativo. Os valores numéricos obtidos foram somados e a média calculada para, assim, serem transformadas em porcentagem. Os valores percentuais obtidos foram utilizados para determinar o efeito inibitório da atividade mitocondrial das células segundo a equação:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{média da densidade ótica do grupo teste}}{\text{média da densidade ótica do controle negativo}^*} \times 100$$

*células sem tratamento

E classificada de acordo com Sjögren et al., (2000):

Tabela 3. Gradação da citotoxicidade em relação ao percentual de sobrevivência celular

Citotoxicidade	Viabilidade celular
Não citotóxico	Maior que 90%
Ligeiramente citotóxico	60-90%
Moderadamente citotóxico	30-59%
Severamente citotóxico	Menor ou igual a 30%

4.6 Avaliação do grau de conversão

O grau de conversão corresponde a medida da porcentagem de ligações duplas entre carbonos do monômero que se convertem em ligações simples decorrente do processo de polimerização. A avaliação do grau de conversão % DC das resinas compostas foi feita através de Espectrofotometria de Infravermelho (FTIR), no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , em um equipamento da (Perkin Elmer modelo Spectrum 2000), no modo de absorbância. Foram realizados 32 scans para cada amostra com uma resolução de 2,0 cm^{-1} .

Para o teste foram preparados conforme descrito no item 5.4, seis espécimes de cada material testado ($n=6$), que foram imediatamente armazenados em recipientes escuros. Amostras dos compósitos não polimerizados também foram analisados ao FTIR. Posteriormente, esses espécimes foram transformados em pastilhas num pastilhador de aço inoxidável (Perkin Elmer). Para isso, os espécimes de cada compósito foram diluídos em KBr (brometo de potássio) Merck® em grau analítico (5 mg de compósito para 100 mg de KBr), masserados em almofariz de ágata e prensados, de modo que formassem pastilhas com espessura aproximada de 0,5 mm (10 ton – 40 s). Essas foram então colocadas uma de cada vez no suporte de amostra do dispositivo e os espectros foram registrados. O software utilizado no tratamento dos dados foi o do próprio equipamento (Spectrum v 5.3.1 for Windows® - Perkin Elmer).

A determinação do grau de conversão das resinas a base de metacrilato (Filtek Z100; Filtek Z350XT e Filtek Z250; 3M ESPE) foi verificada através da diminuição do alongamento da banda do carbono alifático C=C do metacrilato, em 1638 cm^{-1} , durante o processo de polimerização. Como ligação estável–padrão interno foi utilizado a banda de absorção aromática em 1608 cm^{-1} . Sendo o grau de conversão das resinas de metacrilato calculado a partir da equação:

$$(\%C=C) = \frac{(\text{alifático C=C/ aromático C=C}) \text{ polímero}}{(\text{alifático C=C/ aromático C=C}) \text{ monômero}} \times 100$$

Para a resina a base de silorano (Filtek P90 3M ESPE), o grau de conversão DC foi calculado através da diminuição da intensidade da ligação C-O-C (883 cm^{-1}), como padrão interno também foi utilizada a ligação C=C aromática (1608 cm^{-1}). Sendo o grau de conversão das resinas de Silorano calculado a partir da equação:

$$(\%C-O-C) = \frac{(\text{oxirano (C-O-C)/aromático C=C}) \text{ polímero}}{(\text{oxirano (C-O-C)/aromático C=C}) \text{ monômero}} \times 100$$

Os dados do grau de conversão foram então analisados com auxílio do programa OriginPro 7.0, e submetidos à análise estatística pelo teste de ANOVA com correção de Bonferroni ($p < 0,05$), com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade celular

As Figuras 10, 11 e 12 revelam o aspecto geral das culturas de células gengivais estabelecidas neste estudo. Sob microscópio invertido de luz, as células jovens apresentavam formatos aleatórios sem padrão de crescimento específico (Fig.10). A partir das próximas passagens, a maioria das células já apresentavam formatos semelhantes a fibroblastos, com formato afilado e processos celulares estendidos (Fig.11). A confluência celular pode ser observada na Figura 12. Essas fotos foram trabalhadas utilizando inversão de cores.

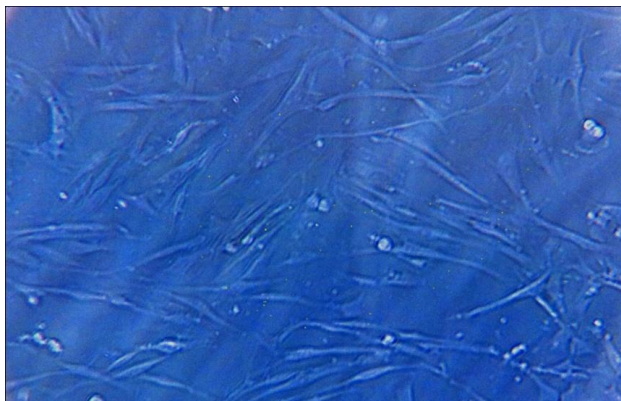


Fig. 10 Células jovens

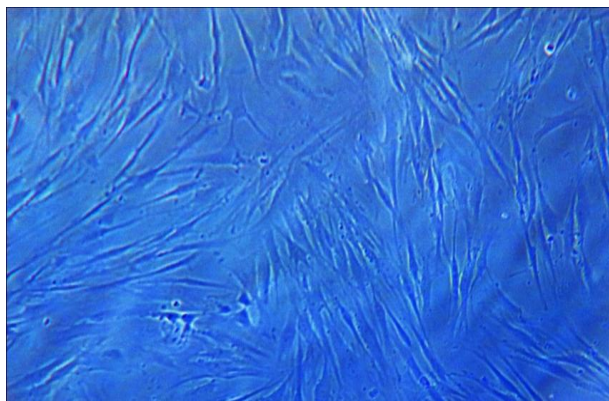


Fig. 11 Semelhança com fibroblastos

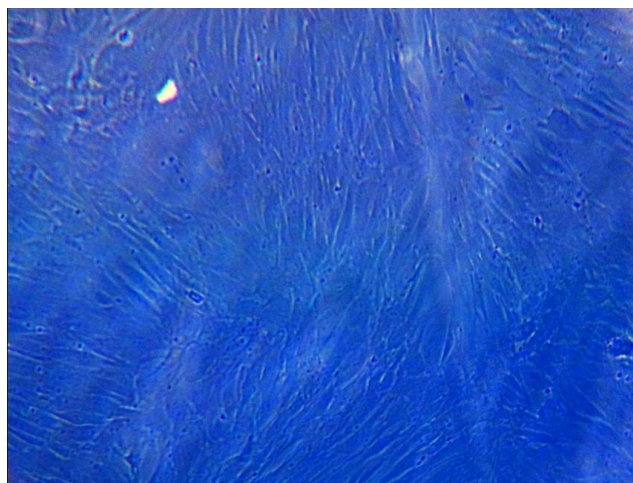


Fig.12 Confluência celular

Os Gráficos 1 e 2 mostram a viabilidade dos fibroblastos gengivais- após o contato indireto com os materiais testados previamente incubados por 24 hs e 12 dias determinada pelo teste de MTT.

No tempo de 24 horas, a resina Filtek Z100 3M ESPE foi a única que apresentou redução significativa da viabilidade celular em relação ao grupo controle, mostrando-se ser ligeiramente citotóxica ($\approx 85\%$ de viabilidade celular). Os outros materiais testados exibiram um perfil de não citotoxicidade (%viabilidade celular de $\approx 95\%$). Para todas as resinas avaliadas, inclusive a Filtek Z100, a variação no tempo de polimerização não interferiu de forma significativa no percentual de viabilidade celular.

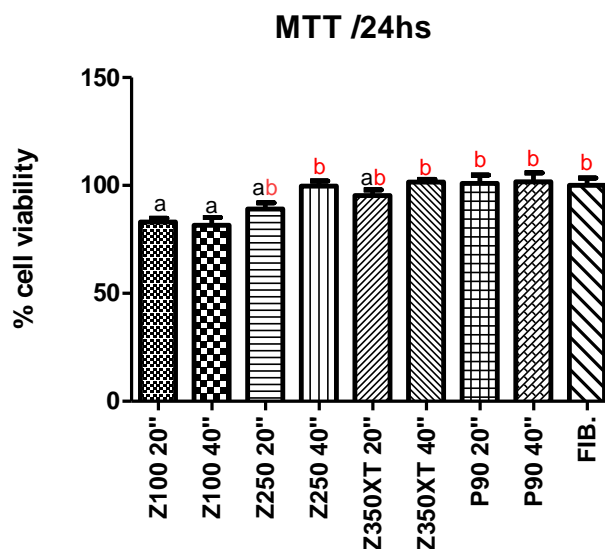


Gráfico 1: Porcentagem de viabilidade celular nos experimentos com as resinas incubadas por 24hs, medida por meio do ensaio de MTT. (Grupos com a mesma letra são estatisticamente semelhantes).

Para o tempo de 12 dias, o mesmo comportamento foi observado entre os materiais testados. Somente a resina Filtek Z100 3M ESPE quando fotoativada tanto por 20 quanto por 40s que apresentou redução significativa da viabilidade celular em relação ao grupo controle. A variação no tempo de polimerização de 20 ou 40 segundos também não interferiu na porcentagem de viabilidade celular dos materiais testados.

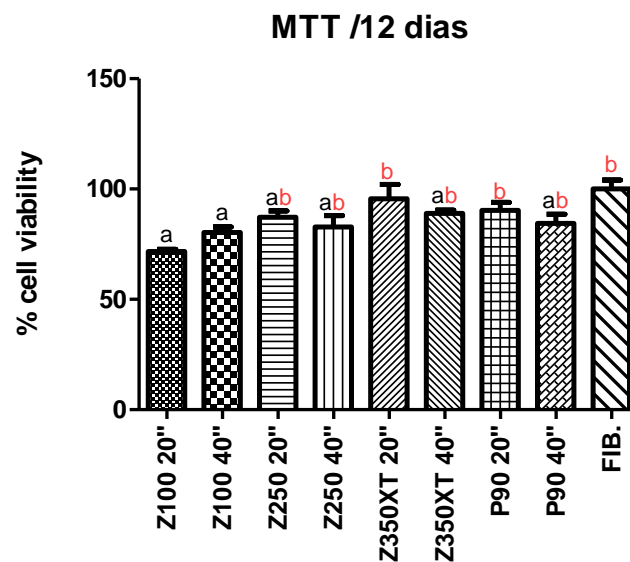


Gráfico 2: Porcentagem de viabilidade celular nos experimentos com as resinas incubadas por 12 dias, medida por meio do ensaio de MTT.(Grupos com a mesma letra são estatisticamente semelhantes).

Os gráficos 3,4,5,6 comparam a citotoxicidade entre os mesmos compósitos, confeccionados no mesmo tempo de polimerização, mas incubados por dois períodos diferentes: 24 horas ou 12 dias. Considerando-se o mesmo grupo (mesmo compósito, e mesmo tempo de polimerização), não houve variação na citotoxicidade quando o tempo de incubação foi alterado em 24 horas ou 12 dias. As resinas Filtek Z250 e Filtek Z350XT tiveram variações na citotoxicidade entre grupos distintos quando o tempo de incubação foi alterado.

Gráfico 3

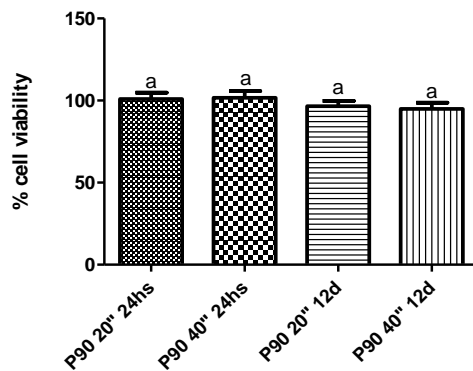


Gráfico 4

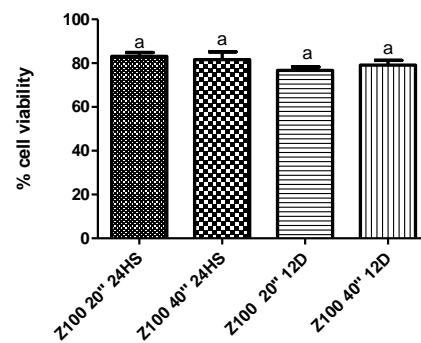


Gráfico 5

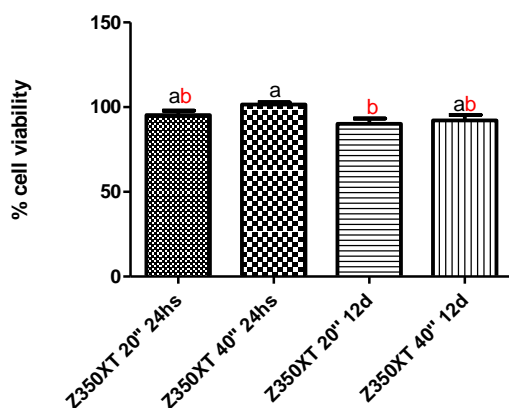
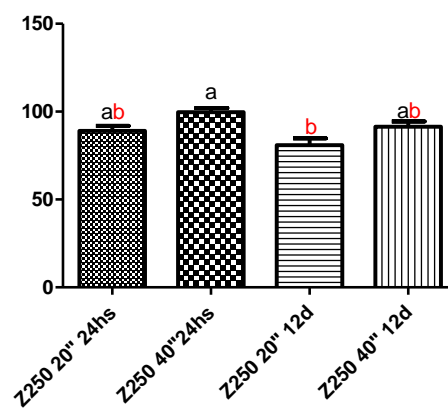


Gráfico 6



Gráficos 3, 4, 5 e 6: Comparação da citotoxicidade dos compósitos de acordo com a variação no tempo de incubação. (Grupos com a mesma letra são estatisticamente semelhantes).

5.2 Grau de conversão – FTIR

O grau de conversão das resinas compostas testadas, obtido pelo software do equipamento (Spectrum v 5.3.1 for Windows[®] - Perkin Elmer) está apresentado na fig.13. Através do tratamento dos dados, o grau de conversão foi determinado a partir da interpretação dos gráficos gerados, e dos valores extraídos desses. Com base nas bandas de interesse obtidas dos gráficos foi possível calcular a porcentagem de ligações duplas dos monômeros que foram convertidas em simples ligações no polímero (figs.13,14 e 15).

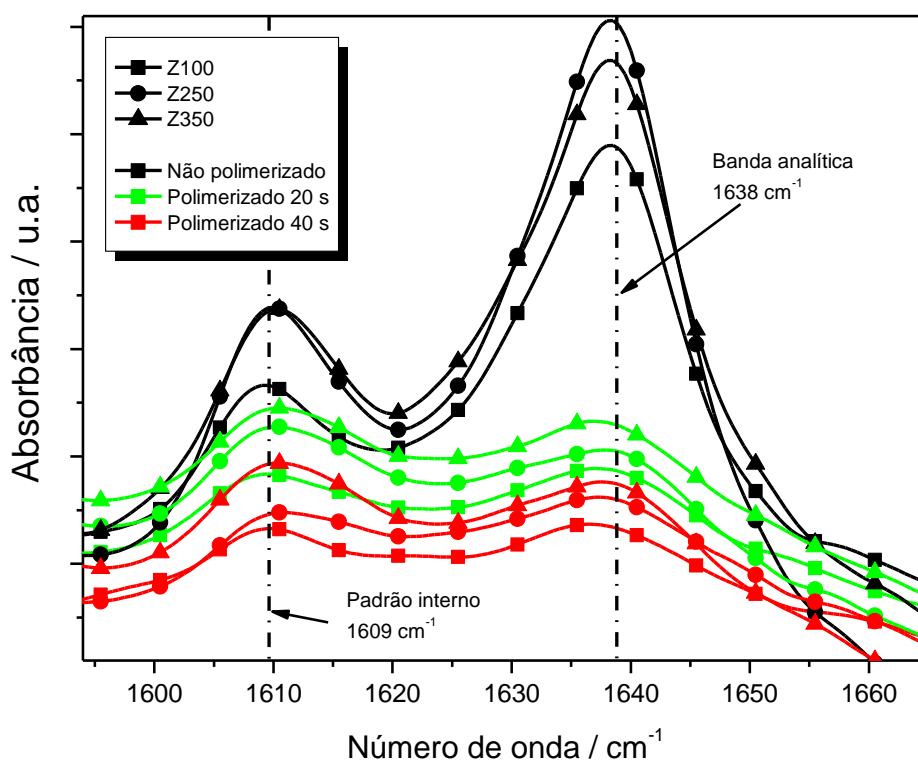


Fig.13 Espectro resultante do grau de conversão dos compósitos de metacrilato.

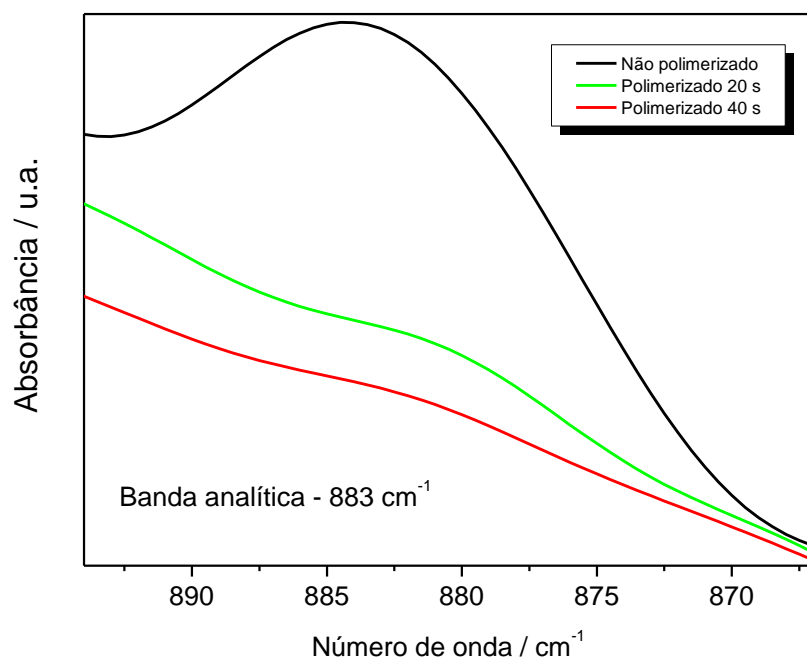
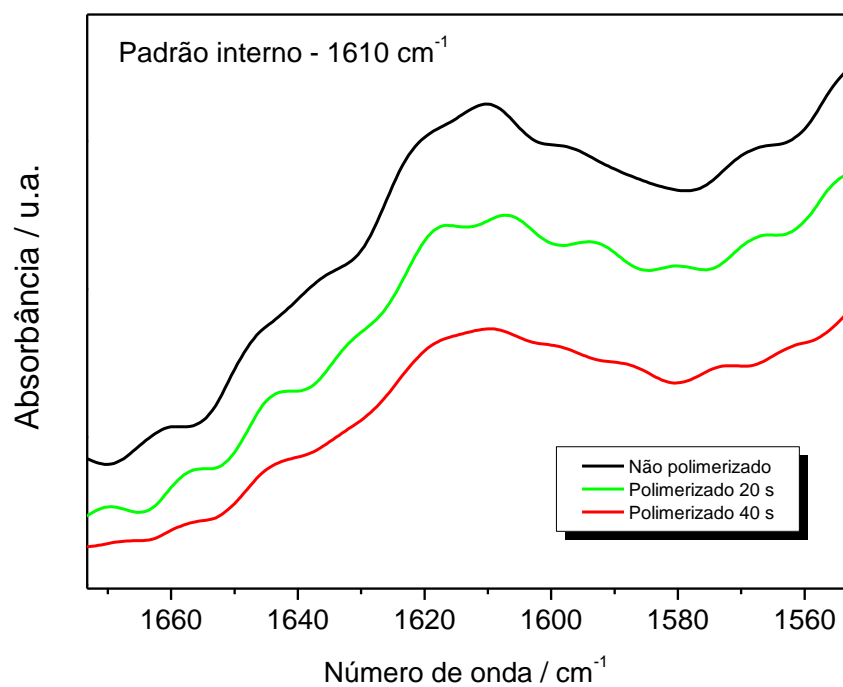


Fig. 14 Espectro resultante do compósito de Silorano, evidenciando a banda analítica utilizada no cálculo do seu grau de conversão.



Figs 15 Espectro resultante do compósito de Silorano, evidenciando o padrão interno utilizado no cálculo do seu grau de conversão.

Os dados obtidos pela análise por FTIR de cada material testado estão representados nos gráficos 7, 8, 9, 10 e 11. As resinas Filtek Z100 (gráfico 7), e Filtek P90 (gráfico 8) demonstraram diferenças estatisticamente significantes no grau de conversão quando polimerizadas tanto por 20 quanto por 40 segundos, sendo que em ambas a porcentagem de conversão foi maior no tempo de 40s quando comparado com o de 20s. As resinas Filtek Z350XT (gráfico 9) e Filtek Z250 (gráfico 10) apresentaram mesmo comportamento quando polimerizadas por 20 ou 40 segundos.

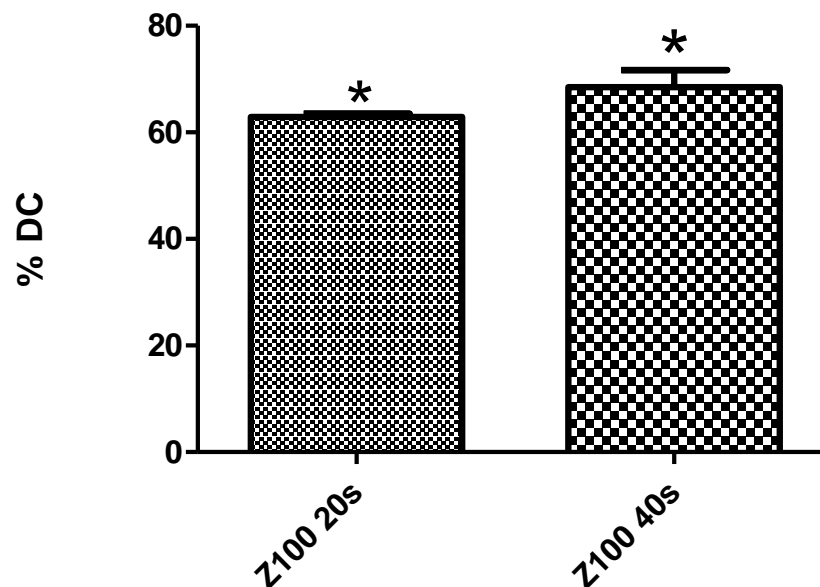


Gráfico 7: Comparação do grau de conversão da resina Filtek Z100, fotopolimerizada nos tempos de 20 e 40s. (* diferença estatisticamente significante $p < 0.05$)

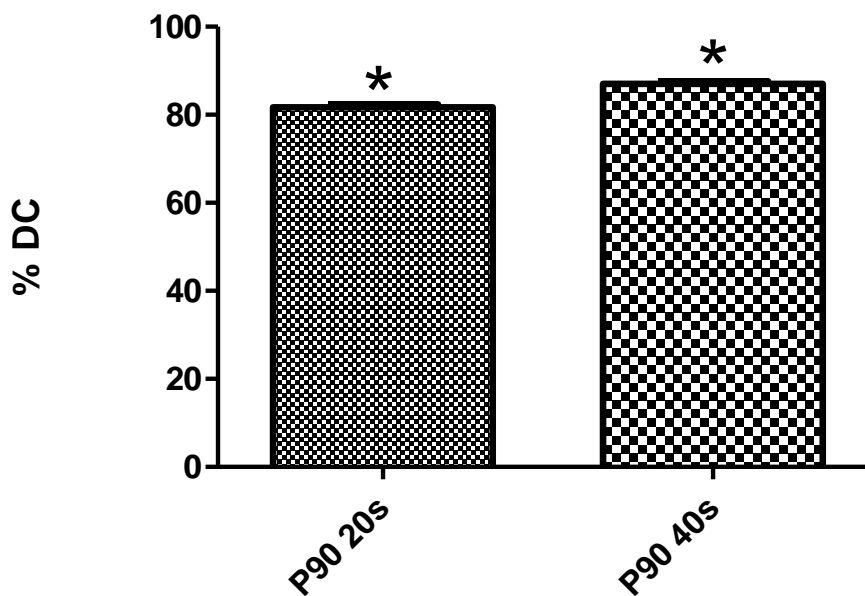


Gráfico 8: Comparação do grau de conversão da resina Filtek P90, fotopolimerizada nos tempos de 20 e 40s. (* diferença estatisticamente significativa $p < 0.05$).

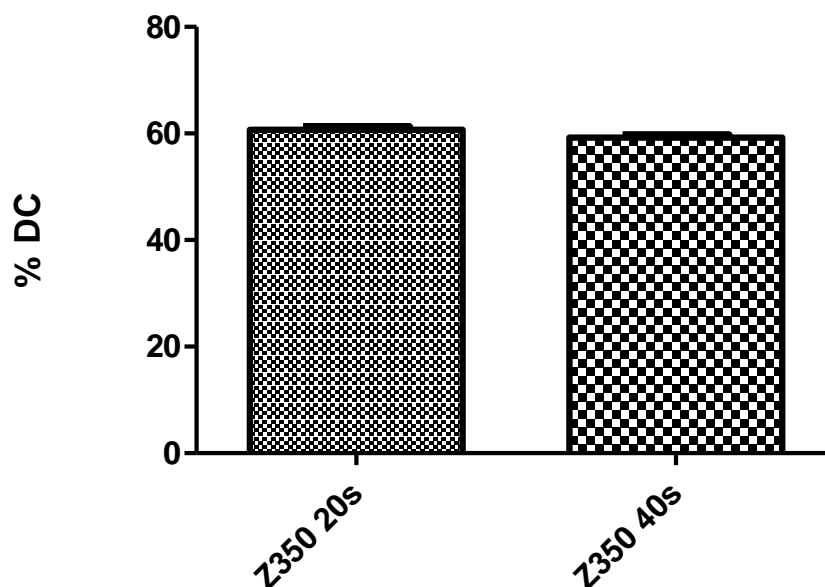


Gráfico 9: Comparação do grau de conversão da resina Z350XT, fotopolimerizada nos tempos de 20 e 40s.

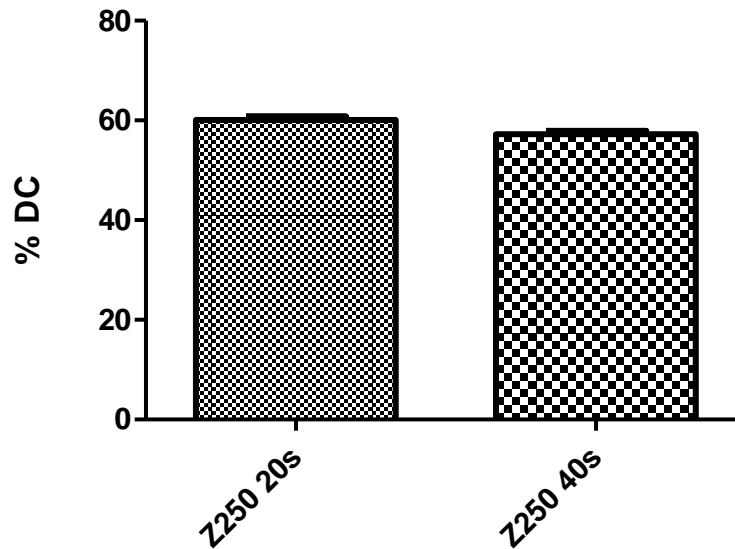


Gráfico 10: Comparação do grau de conversão da resina Filtek Z250, fotopolimerizada nos tempos de 20 e 40s.

Entre todos os compósitos testados a resina Filtek Z250 tanto em 20 como em 40s foi a que apresentou a menor taxa de conversão em torno de 60%, resultado esse não estatisticamente diferente do apresentado pela resina Filtek Z350XT 20 e 40s. Já a resina Filtek P90 40s foi a que apresentou a maior conversão ($\approx 87\%$) (gráfico 11).

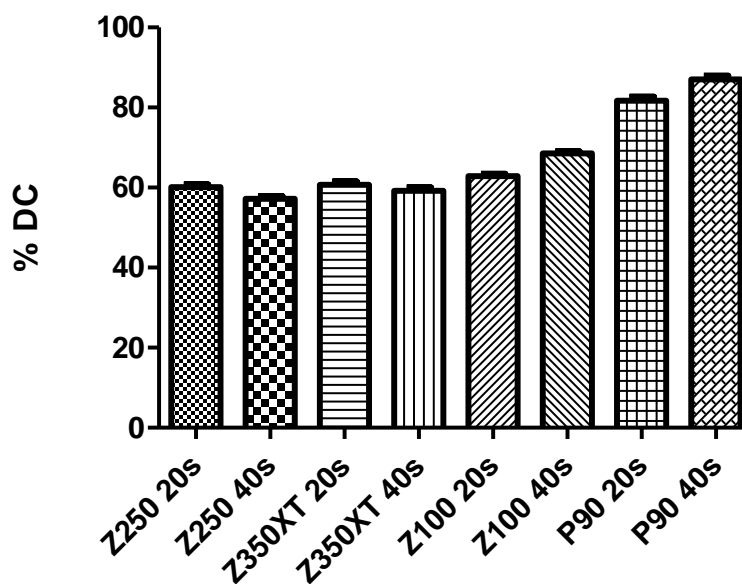


Gráfico 11: Comparação do grau de conversão de todos os compósitos utilizados.

6. DISCUSSÃO

O perfil de citotoxicidade *in vitro* como um primeiro fator de biocompatibilidade de um material dentário deve ser determinado por meio de cultura celular (Feigal et al., 1985; Huang & Chang, 2002). Além de apresentar fácil reprodução nos mais diferentes laboratórios em diversas partes do mundo, os testes *in vitro*, através de cultura de células, apresentam também custos relativamente baixos e maior rapidez de execução, quando comparados aos testes *in vivo* (Hanks et al., 1991). Além disso, o experimento *in vitro* tem a vantagem de ser facilmente controlado, simples e reproduzível, o que pode não ocorrer em experimentos *in vivo* onde considerações éticas e legais são obstáculos para a realização de trabalhos científicos.

Muitos estudos têm empregado diversas linhagens celulares para avaliação dos efeitos tóxicos de diferentes materiais utilizados em Odontologia (Annunziata et.al 1996; Moharamzadeh et. al. 2007; Ergun et.al. 2007) . Dentre essas células podemos citar: aquelas cultivadas primariamente a partir de tecidos ou cortes - fibroblastos gengivais; fibroblastos pulpares; células epiteliais; e aquelas imortalizadas - derivadas de animais ou seres humanos. Todavia, recentes investigações têm demonstrado que tanto células adquiridas diretamente da polpa dental ou tecido periodontal, como aquelas mantidas em laboratório através de uma linhagem contínua, são capazes de responder de forma diferente aos efeitos tóxicos pertinentes a um mesmo material (Leyhausen et al., 1998; Geurtsen et al., 1998a; Heil et al., 2002). Segundo MacDougall et al., (1998), existe uma grande variabilidade entre as respostas citotóxicas de diferentes linhagens celulares aos materiais testados, sendo que até o momento, não há uma definição clara sobre qual tipo celular seria o mais indicado para os protocolos empregados na avaliação da toxicidade de materiais experimentais.

Apesar de muitas pesquisas demonstrarem que existam diferenças nas respostas entre as diferentes linhagens celulares nos testes de citotoxicidade, Moharamzadeh et al.(2007) acreditam que fibroblastos gengivais seriam uma boa opção em termos de avaliação dos efeitos adversos provenientes dos materiais restauradores. Segundo esses autores, fibroblastos gengivais

humanos são células clinicamente relevantes e que estão em proximidade com materiais restauradores na cavidade oral, quando, por exemplo, são realizadas restaurações tipo classe II. Além disso, são sensíveis, podendo ser facilmente isolados e cultivadas em meios de cultura normais, o que permite maior aproximação do experimento *in vitro* com a situação *in vivo*. No presente estudo foram utilizadas culturas primárias de fibroblastos gengivais, sendo todos os experimentos realizados em culturas celulares confluentes e poucas passagens utilizadas para manter as células o mais próximo possível do seu fenótipo original (Arenholt-Bindslev & Bleeg, 1990) (Figs. 8,9 e 10).

Os tecidos gengivais utilizados foram obtidos de gengivectomias da região anterior da cavidade oral, uma vez que estes contêm maior quantidade de células gengivais e menor quantidade de fibras. Como existem diferenças entre linhagens celulares de indivíduos distintos com relação às respostas aos testes (Moharamzadeh et al., 2007), optou-se pela utilização, em todos os experimentos do tecido gengival de um mesmo doador, para que assim os resultados obtidos fossem aceitáveis e passíveis de comparação.

O teste utilizado para avaliação da citotoxicidade dos materiais foi o MTT, o qual é o mais comumente usado para avaliação de viabilidade celular, devido à sua confiabilidade e sensibilidade (Ergun et al., 2011). Como as resinas apresentam composições distintas, variando no tipo e quantidade de carga que possuem e no tipo e quantidade de monômeros e diluentes presentes, cada uma apresenta, em culturas celulares, comportamento citotóxico único, podendo causar desde a liberação de mediadores inflamatórios (Moharamzadeh et al., 2007), até a supressão da síntese protéica (Hanks et al., 1991) ou inibição da atividade mitocondrial (Issa et al., 2002) .

Tanto a composição química da resina quanto a porcentagem de conversão de monômeros dos materiais dentais são considerados como causa potencial de citotoxicidade (Ergun et al., 2011). A conversão de compósitos resinosos não é completa, assim monômeros não reagidos podem ser liberados no ambiente oral e causar diversos efeitos tóxicos (Kong et al., 2008). A espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FTIR) tem sido

bastante utilizada para caracterização do grau de conversão (DC- do inglês *Degree of Conversion*) de materiais polimerizáveis. Nela, o cálculo de DC é realizado através do espectro obtido dos materiais, onde a diminuição no alongamento da banda do carbono vinil (C=C) é mensurada antes e depois da fotopolimerização (Fig.13) e comparada com um padrão interno. Segundo Gauthier et al. (2005), uma medição exata de DC é essencial para mostrar a relação entre o mesmo e propriedades mecânicas, bem como o potencial de liberação de monômeros não reagidos de biomateriais. Por meio do método de FTIR, o grau de conversão dos compósitos testados foi mensurado para os dois tempos de fotoativação estudados (20s e 40s) e relacionado com a citotoxicidade desses materiais.

Dentre os diversos materiais restauradores disponíveis, as resinas compostas têm sido muito utilizadas para confecção de restaurações diretas devido às suas propriedades estéticas e mecânicas. Esse material consiste de partículas de carga embebidas em matriz resinosa orgânica quimicamente reativa. Partículas de carga são materiais tipicamente inorgânicos, como vidro, geralmente tratados na sua superfície (silanizados), possibilitando a união química à matriz de resina. Quase todas as resinas compostas à base de Bis-GMA utilizam oligoetilnoglicóis diluentes como TEGDMA ou UDMA, que são polimerizados por radicais como a resina primária. Estudos prévios, no entanto, têm demonstrado que esses dimetacrilatos exibem considerável efeito citotóxico sobre culturas celulares (Hanks et al., 1991; Kong et al., 2008). Em cada compósito, essa citotoxicidade depende da liberação dos dimetacrilatos (monômeros livres não polimerizados e componentes liberados devido à degradação e erosão que ocorrem ao longo do tempo) e está diretamente relacionada com o grau de conversão e a composição de cada resina, que varia de fabricante para fabricante (Franz et al., 2008). Para esse estudo, foram utilizados quatro compósitos: três à base de metacrilato (Filtek Z100, Filtek Z250 e Filtek Z350XT) e um à base de silorano (Filtek P90), sendo todos pertencentes ao mesmo fabricante (3M ESPE).

O compósito de Silorano (Filtek P90) foi desenvolvido em 2007, com o objetivo de contornar o problema da contração de polimerização dos

compósitos de metacrilato (Guggerberger et al., 2000, Eckert et al., 2004). Esse se baseia na substituição dos monômeros de metacrilato por sistemas epóxicos de abertura de anel- Silorano (Leprince et al., 2010). O monômero de Silorano é obtido pela reação de oxirano e siloxano, e mostrou ter contração volumétrica de apenas 0,99% vol (Al-boni et al., 2010), enquanto compósitos de metacrilato têm uma média de contração em torno de 2,3 a 3 % vol (Duarte Jr. et al., 2009). Esse novo compósito demonstrou possuir propriedades mecânicas comparáveis as dos compósitos de metacrilato (Duarte Jr. et al., 2009) e menor potencial de adesão bacteriana (Ralf et al., 2007). Entretanto, ainda é desconhecido seu efeito tóxico sobre as células do organismo. Por tal motivo, esse compósito foi utilizado neste estudo, sendo os compósitos de metacrilato utilizados como forma de comparação. A família das resinas Z100, Z250 e Z350 XT foi utilizada por demonstrar a evolução deste material restaurador, tendo sido referência nas alterações de conversão, quantidade de diluentes e evolução para partículas nanométricas.

Durante a confecção dos espécimes de cada material, foi seguido rígido protocolo, onde os compósitos foram inseridos em matrizes de vidro, vedados com tiras de poliéster e fotopolimerizados. De acordo com Tang et al.(1999), a presença da camada de oxigênio inibitória durante a fotopolimerização de compósitos causa uma diminuição de 33% da viabilidade celular . Apesar do fabricante da resina de silorano Filtek P90 afirmar que nesse material não existe a camada de inibição, o mesmo protocolo foi seguido para todos os espécimes (Figs. 3, 4 e 5). Também como padronização, todos foram confeccionados na cor A2. Esta padronização evitaria possíveis alterações causadas pelo uso de maior ou menor quantidade de pigmentos nos compósitos (Sigusch et al., 2012).

Os espécimes confeccionados foram armazenados em meio DMEM por 24 horas e 12 dias sem soro fetal bovino (Fig.7), pois segundo Takeda et al. (1993) componentes liberados de materiais resinosos podem interagir com o soro fetal e influenciar nos resultados. Em seguida, os compostos solúveis resultantes foram colocados em contato com a cultura celular, pois, conforme Tang et al. (1999), deve ser evitado o contato direto dos materiais com as

células, uma vez que variações na superfície de contato entre os espécimes e as células podem causar variações nos resultados.

No teste de citotoxicidade realizado, a única resina que apresentou considerável redução na viabilidade celular ($\approx 15\%$) tanto após 24h quanto após 12 dias de pré-incubação foi a Filtek Z100 3M ESPE (20 e 40s) (gráficos 1 e 2). Levando-se em consideração o grau de conversão da resina Z100, não seria esperado que ela apresentasse alta citotoxicidade. Com a menor presença de monômeros residuais, esperar-se-ia menor liberação de dimetacrilatos no meio de armazenagem. Entretanto, isto não aconteceu. Comparando-a com a Filtek Z250, que apresenta mais componentes orgânicos e mais diluentes (tabela 1), esta última deveria apresentar maior citotoxicidade. A literatura tem demonstrado que o monômero de Bis-GMA é considerado como o mais citotóxico dentre todos os outros monômeros (Kong et al., 2008; Chen et al., 2003; Moharamzadeh et al., 2007). Deve-se, entretanto, discutir-se as características das cadeias poliméricas formadas. Enquanto alguns compósitos apresentam em sua composição mais ou menos componentes, possivelmente, a cadeia gerada seja mais estável e assim possa liberar menos monômeros para o meio enquanto, a cadeia formada apenas por Bis-GMA e TEG-DMA da resina Z100, embora apresente grau de conversão elevado não possua a mesma estabilidade.

As ligações formadas entre as moléculas do material ocorrem no estágio inicial da fotoativação, e vão se propagando formando uma rede, ou seja, o polímero. A intensidade de luz do aparelho está diretamente relacionada à qualidade dessa reticulação (Ferracane & Greener, 1984). Neste estudo as resinas a base de Silorano nos dois tempos estudados foram as que apresentaram maior grau de conversão (20s- 81,7% e 40s- 87%), sendo a resina Filtek Z250 também nos dois tempos a que apresentou a menor conversão (20s- 60,1% e 40s- 57,2%) (apêndice 4). Vários autores (Papadogiannis et al., 2009; Palin et al., 2004) encontraram valores menores para o grau de conversão da resina de Silorano (em torno de 50 a 60%) em comparação com o deste estudo, o que provavelmente possa ter acontecido devido a esses autores terem utilizado condições diferentes para realização

dos seus experimentos. Neste estudo, utilizou-se um aparelho de LED para fotopolimerizar os espécimes, e esses foram avaliados em, no mínimo, 3 dias após terem sido confeccionados. Este aparelho não possui ponta transmissora de luz, ficando o LED próximo à superfície da resina composta.

A compatibilidade entre a fonte de luz e a resina composta fará a melhor conversão de monômeros em polímeros, garantindo sucesso clínico das restaurações de resina composta. A efetividade da polimerização está relacionada com o tipo de aparelho fotopolimerizador utilizado e suas características, sendo que para se obter uma conversão satisfatória dos compósitos, é importante correlacionar área da ponta do aparelho com a intensidade e tempo de fotoativação. Além disso, deve-se levar em consideração o agente fotossensível e o comprimento de onda dos aparelhos.

Para escolha do tempo de irradiação, deve-se levar em consideração a densidade de energia do aparelho fotopolimerizador. A densidade de energia é dada pela potência do aparelho (em miliwatts - mW) dividida pela área da ponta ativa do aparelho (em cm^2). Desta forma, mesmo que um aparelho possua uma fonte de luz com boa potência, se sua ponta ativa tiver uma área grande, esta será espalhada, e a intensidade final será diminuída. Por outro lado, aparelhos que utilizam pontas do tipo turbo conseguem um aumento significativo da densidade de energia pela diminuição do seu diâmetro de saída (Price et al., 2010).

O produto da densidade de energia pelo tempo de irradiação determina a dose (em Joules). Em nosso estudo, utilizando um aparelho com $600\text{mW}/\text{cm}^2$, obtivemos doses de 12J e 24J. DÁlpino et al. (2011) avaliaram as doses satisfatórias para polimerizar resinas a base de metacrilato e silorano, e demonstraram que 20J são satisfatórios para ambas as resinas. Neste estudo, a resina a base de silorano apresentou dureza superficial maior com 40J, porém os autores relataram que este acréscimo na dureza é irrelevante clinicamente.

As características de cura de um compósito são altamente dependentes do tipo e quantidade de fotoiniciadores presentes. A canforoquinona (CQ) é o agente fotossensibilizante utilizado na maioria das marcas comerciais disponíveis no mercado. O aumento na quantidade de canforoquinona das resinas compostas leva a maior grau de conversão dos monômeros, melhorando as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade destes materiais (Peutzfeldt et al., 1989; Rueggeberg et al., 1997). Contudo, a canforoquinona é um pó de cor amarelo intenso, e sua adição causa amarelamento do material, dificultando sua incorporação quando se deseja cores mais claras (Park et al., 1999; Sun et al., 2000; Yoshida et al., 1994). Desta forma, a quantidade de CQ presente nas resinas compostas varia bastante, estando presente em concentrações entre 0,17 e 1,03% p/p (Taira et al., 1988) da fase resinosa. Alvim et al. (2007), demonstraram ainda que, em uma mesma marca comercial, a quantidade e o tipo de fotoiniciador podem variar em função da cor utilizada.

A canforoquinona absorve luz com comprimento de onda entre 460 e 480 nm, o que a torna compatível com todos os aparelhos fotopolimerizadores de luz halógena e de LED. Outros fotoiniciadores de cor mais clara como: óxido bis-aquil fosfínico (BAPO) e o óxido mono-aquil-fosfínico (MAPO ou Lucirin TPO), absorvem luz com comprimento de onda inferior à canforoquinona, mais próximos ao ultravioleta. Esse comprimento de onda é perfeitamente coberto pelas unidades de luz halógena, mas não é atingido pelos aparelhos que utilizam LED azuis, devido ao seu estreito espectro de emissão. Isso faz com que as resinas contendo esses fotoiniciadores não sejam adequadamente polimerizadas por estes aparelhos, apresentando baixo grau de conversão e baixas propriedades mecânicas. No nosso estudo, os quatro compósitos testados apresentavam a canforoquinona como agente fotossensível.

O tempo utilizado para polimerizar uma resina composta varia de acordo com as recomendações dos fabricantes. Respeitar o tempo preconizado pelo fabricante é importante para que o compósito tenha uma eficiente cura, e

assim, apresente boas propriedades mecânicas e biológicas (Ergun et al., 2011). Para cada tipo de material, um determinado tempo é necessário para que haja a conversão dos monômeros em uma cadeia polimérica. Esse tempo varia de acordo com a composição de cada produto, e depende do tamanho, forma e distribuição das partículas de carga, da química e quantidade de monômeros constituintes, assim como da cor e opacidade de cada compósito (Mundim et al., 2010). Segundo a 3M ESPE, o tempo indicado para que haja polimerização satisfatória dos compósitos Filtek P90 e Filtek Z100 é de 40s, enquanto para os outros dois compósitos Filtek Z250 e Filtek Z350XT apenas 20s. Uma conversão incompleta dos compósitos pode resultar na liberação de monômeros não reagidos e outros componentes na cavidade oral, causando assim uma série de efeitos adversos como: irritação das mucosas, hipersensibilidade, reações anafiláticas, injúria pulpar, dentre outras (Moharamzadeh et al., 2007). No entanto, no presente estudo, a variação no tempo de polimerização de 20 ou 40 segundos realizada em todos os materiais não demonstrou diferença com relação ao nível de citotoxicidade (gráficos 1 e 2), o que não contraria as recomendações do fabricante sobre o tempo necessário para que haja conversão completa dos compósitos estudados. Contudo esses achados devem ser considerados para as condições experimentais utilizadas, sendo que resultados diferentes podem acontecer quando são utilizados aparelhos fotoativadores que, por exemplo, tenham diferente formato de ponta ativa e emitam outra intensidade de energia, ou que apresentem distinto espectro de emissão. Assim, torna-se claro que fabricantes devam explicitar aos cirurgiões-dentistas o tempo necessário para fotopolimerizar satisfatoriamente os compósitos, de acordo com cada aparelho fotoativador existente no mercado.

Segundo alguns autores (Moharamzadeh et al., 2007; Issa et al., 2002) a liberação de monômeros dos compósitos resinosos é maior em 24h. Portanto, o esperado é que a maior toxicidade de compósitos ocorra durante as primeiras 24h. No entanto, apesar dos materiais resinosos exibirem os maiores efeitos tóxicos nesse período, contínua liberação em taxa reduzida continua a acontecer (Issa et al., 2002; Ergun et al., 2011). Neste estudo, analisou-se a citotoxicidade de compósitos resinosos armazenados por dois tempos 24h e 12

dias, e verificou-se que não existe diferença na citotoxicidade entre os mesmos grupos de materiais (mesmo material e mesmo tempo de fotopolimerização) e com o grupo controle quando esses são incubados pelos dois tempos experimentais (gráficos 3, 4, 5 e 6). Verificando-se, assim, que provavelmente exista uma taxa de liberação muito reduzida e não significativa de monômeros não reagidos ao longo do tempo, sendo que a liberação completa e responsável pela citotoxicidade do compósito ocorra realmente nas primeiras 24h.

As resinas de Silorano apareceram no mercado como uma alternativa de substituição às resinas de Metacrilato, uma vez que surgiram com a promissora característica de um compósito com menor contração de polimerização, que é um dos grandes problemas das resinas compostas (Weimann et al., 2010). No entanto, essa nova química trouxe consigo dúvidas e questionamentos sobre as propriedades físico-químicas e biocompatibilidade do compósito. Os resultados demonstraram que a resina de Silorano apresentou comportamento semelhante às resinas de metacrilato, exibindo um perfil de não-citotoxicidade (% redução da viabilidade celular \approx 5%) (gráficos 1 e 2). Este achado evidencia que o monômero de Silorano, apesar de sua propriedade hidrofóbica tornando-o menos susceptível à degradação hidrolítica, e menor potencial de adesão bacteriana (Burgers et al., 2008) apresentou toxicidade semelhante aos monômeros de metacrilato, quando em contato com culturas celulares.

O grau de conversão da resina composta é um importante fator no qual as duplas ligações de carbono são convertidas em ligações simples. Assim, há uma quebra de uma dupla ligação do monômero, formando um complexo radical-monômero, resultando em uma molécula maior, ou seja, o polímero. Muitos fatores podem influenciar na polimerização das resinas compostas, os principais são: o tempo de exposição, a intensidade da luz e o comprimento de onda (Sigusch et al., 2011). A compatibilidade entre a fonte de luz e a resina composta fará a melhor conversão de monômeros em polímeros, garantindo sucesso clínico das restaurações de resina composta. Segundo Silikas et al. (2000) variações no tempo e na intensidade de polimerização exercem efeitos significativos no grau de conversão, sendo que quanto maior o tempo de

exposição e a intensidade de luz maior é a conversão, o que depende portanto do tipo de aparelho fotopolimerizador utilizado. No nosso estudo, as resinas Filtek Z100 e Filtek P90 exibiram diferença estatisticamente significativa no grau de conversão quando foram polimerizadas por 20 ou 40s, sendo que para essas resinas a maior conversão ocorreu no tempo de 40 segundos (gráficos 7 e 9). Ao contrário, as resinas Filtek Z350XT e Filtek Z250 não demonstraram variação no seu grau de conversão quando foram polimerizadas por 20 ou 40 segundos (gráficos 8 e 9). Esses achados confirmam as informações fornecidas pelo fabricante de que 20 segundos são suficientes para polimerizar de forma satisfatória a estrutura dessas resinas, quando se utiliza o aparelho fotopolimerizador (LED Flash lite Disculs). Segundo Cavalheiros et al. (2004), o aumento do tempo de exposição à luz não aumenta o grau de conversão, devido ao fato de se obter uma reação de saturação das cadeias poliméricas da resina composta.

A cinética de polimerização dos compósitos de metacrilato e silorano é baseada na reação entre radicais livres e espécies catiônicas reativas, no entanto as resinas de Silorano também apresentam uma nova química de abertura de anéis. Segundo o estudo de Palin et al. (2005), o compósito de Silorano apresentou grau de conversão maior que os compósitos de metacrilato. Para esses autores, a polimerização de compósitos de Silorano gera espécies reativas com maior mobilidade que os radicais livres gerados na polimerização dos compósitos de metacrilato, e essa maior mobilidade é a responsável pelo maior grau de conversão observado nos compósitos de Silorano. Corroborando-se com esses achados, no presente estudo o compósito de Silorano Filtek P90 exibiu o maior grau de conversão em comparação com todos os compósitos de metacrilato testados (gráfico 11).

Segundo Papadogiannis et al. (2009), comparação direta entre o grau de conversão de compósitos de Silorano e Metacrilato não é viável, devido à presença de grandes diferenças entre esses compósitos, como: mecanismo de polimerização, composição da matriz orgânica, tipo e percentual de carga inorgânica. Na presente pesquisa, a resina Filtek Z250 apresentou o menor grau de conversão. Por conter maior quantidade de matriz orgânica que os

outros compósitos testados, o esperado seria que a Z250 apresentasse maior grau de conversão. No entanto, isso não aconteceu. Deve-se, entretanto considerar que a química e concentração dos materiais exercem influência nas características da polimerização. A resina Z250 apresenta em sua constituição como diluente o monômero de UDMA (tabela 1). A ausência do diluente TEGDMA poderia explicar nossos achados, pois, de acordo com a literatura Ferracane & Greener (1984), o monômero TEGDMA apresenta alto número de duplas ligações por unidade de peso na cadeia principal, o que pode resultar em alto grau de conversão da cadeia durante a polimerização. No entanto, o monômero de UDMA presente na Z250 apresenta cadeia linear longa, sem anéis aromáticos, o que lhe confere uma maior flexibilidade e, conseqüentemente, também maior grau de conversão monomérica (Ruyter & Oysaed., 1987; Monte Alto et al., 2006) o que contraria nossos achados.

Apesar de autores (Ergun et al., 2011; Issa et al., 2002; Franz et al., 2008) afirmarem que uma incompleta conversão de compósitos resinosos resulta na liberação de monômeros não reagidos e na conseqüente citotoxicidade destes, no presente estudo não houve relação entre o grau de conversão e a citotoxicidade, uma vez que a resina Filtek Z100, apesar de ter sido a mais citotóxica, não foi a que apresentou o menor grau de conversão, que no caso foi da Filtek Z250. Além de que entre espécimes do mesmo compósito, a variação no tempo de polimerização apesar de ter demonstrado alterar o grau de conversão das resinas, não interferiu na citotoxicidade. Portanto, nesse estudo observa-se que, provavelmente a citotoxicidade dos compósitos esteja relacionada com suas composições, concordando assim com a afirmativa de Karaoglanoglu et al. (2010), de que os níveis de citotoxicidade de materiais resinosos restauradores variam de acordo com a quantidade e tipo dos seus componentes constituintes. Assim como com a densidade e estabilidade da ligação polimérica formada, que pode influenciar a liberação de componentes não reagidos.

No entanto é importante que o cirurgião-dentista perceba que, apesar de em nosso estudo não ter havido relação entre grau de conversão e citotoxicidade, a fonte de luz empregada exerce influência sim na citotoxicidade

dos compósitos. Uma vez que as condições de polimerização como: comprimento de onda, duração de exposição, distância da saída de luz e intensidade de luz influenciam o grau de polimerização dos compósitos. E esses fatores mencionados determinam a dureza do compósito, a profundidade de polimerização e indiretamente a liberação de monômeros residuais citotóxicos. Os resultados são indicativos de que o aparelho de LED utilizado nos testes apresentou características suficientes para que houvesse uma conversão satisfatória dos compósitos, o que poderia não ter acontecido se outros aparelhos fotoativadores tivessem sido utilizados.

É necessário, portanto, que o profissional conheça as características e a composição do material que está utilizando, para que possa escolher uma fonte de luz adequada, obtendo sucesso clínico com restaurações eficientes e duráveis. Embora, os resultados do presente estudo não tenham demonstrado relação entre grau de conversão e citotoxicidade, os dados desta pesquisa não podem ser extrapolados para situações clínicas. Esta etapa de pesquisa resume-se a um primeiro nível de estudo sobre os efeitos biológicos dos materiais através dos quais novos produtos deveriam ser submetidos. Por isso, outras pesquisas tanto em animais de laboratório quanto em dentes de seres humanos devem ser realizadas, para que haja uma avaliação mais detalhada dos compósitos Filtek P90, Filtek Z250 e Filtek Z350XT, uma vez que estes materiais apresentaram os menores efeitos citotóxicos sobre as células gengivais.

7. CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Nos períodos de 24h e 12 dias, de todos os materiais testados, a resina Filtek Z100 3M ESPE nos dois tempos avaliados (20 e 40s), foi a única que causou redução significativa no metabolismo celular das células gengivais;
- A variação no tempo de polimerização dos espécimes não interferiu no percentual de viabilidade celular;
- A alteração no tempo de incubação (24 horas ou 12 dias) dos espécimes de um mesmo grupo (mesmo compósito e mesmo tempo de polimerização) não acarretou variações na citotoxicidade;
- A resina Filtek Z250, tanto em 20s quanto em 40s, apresentou menor grau de conversão ($\approx 60\%$) entre os compósitos testados, sendo esse valor não estatisticamente diferente do valor expresso pela Z350XT. A resina Filtek P90 40s apresentou o maior grau de conversão ($\approx 87\%$);
- As resinas Filtek Z100 e Filtek P90 apresentaram maior grau de conversão quando polimerizadas por 40s, sendo a diferença entre 20 e 40 segundos estatisticamente significante. As resinas Filtek Z350XT e Filtek Z250 não demonstraram diferença estatisticamente significante no grau de conversão, quando polimerizadas pelos tempos de 20 ou 40 segundos;
- Nas condições experimentais utilizadas não houve correlação entre grau de conversão e citotoxicidade dos compósitos avaliados.

8. REFERÊNCIAS

1. Al-Boni R., Raja O. M. Microleakage evaluation of silorane based composite versus methacrylate based composite. *Journal of Conservative Dentistry*, v.13, n.3, p.152-155, jul-sep.2010.
2. Alvim H.H., Alecio A.C., Vasconcellos W.A., Furlan M., Oliveira J.E., Saad J. R. C. Analysis of camphorquinone in composite resins as a function of shade. *Dent Mater*, v.23, p.1245-1249, 2007.
3. Annunziata M., Aversa R., Apicella A., Annunziata A., Apicella D., Buonaiuto C., Guida L. In vitro biological response to a light-cured composite when used for cementation of composite inlays. *Dental Materials*, vol.22, p.1081-1085, 2006.
4. Anusavice KJ. *Phillips – Materiais dentários*. 11 Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
5. Arenholt-Bindslev D & Bleeg H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *International Endodontic Journal* 1990; 23: 84-91.
6. Aw TC., Nicholls JI. Polymerization shrinkage of densely filled resin composites. *Oper Dent*, vol.26, p.498–504, 2001.
7. Boaro L. C. C., Gonçalves F., Guimarães T. C., Braga R. R., Ferracane J. L. Shrinkage and polymerization stress of silorane- and dimer acid-based composites. *Dental Materials*, vol.26s, n.1016, 2009.
8. Boaro L. C. C., Gonçalves F., Guimarães T. C., Ferracane J. L., Versluis A., Braga R. R. Polymerization stress, shrinkage and elastic modulus of current low-shrinkage restorative composites. *Dental Materials*, vol.26, n.1016, p.1144-1150, august 2010.
9. Braga RR., Ballester RY., Ferracane JL. Factors involved in the development of polymerization shrinkage stress in resin composites: a systematic review. *Dental Materials*, vol. 21, p.962–70, 2005.
10. Buegers R., Schneider-Brachert W., Hahnel S., Rosentritt M., Handel G. Streptococcal adhesion to novel low-shrink silorane-based restorative. *Dental Materials*, v.10, n.1016, p.1-7, July.2008.
11. CATÁLOGO 3M ESPE; Filtek P90 Resina composta posterior de baixa contração; 3M ESPE, 2007.

12. Cavalheiros, F.C. Relationship between contraction stress and degree of conversion in restorative composites. *Dent Materials*, v.20, p.936-946, 2004.
13. Chang YC., Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, vol. 91, p.230-4, 2001.
14. Chen RS., Liu CC., Tseng WY., Jeng JH., Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *Journal of Dentistry*, vol.31, p.223-229, 2003.
15. Costa, C.A.S.; Hebling, J.; Hanks, C.T. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper. Dent.*, v.28, n.4, p.365-370, 2003.
16. D'Alpino PH. P; Bechtold P.J.S; Alonso R.C.B; Di Hipólito V., Silikas N., Rodrigues F.P. Methacrylate- and silorane-based composite restorations: Hardness, depth of cure and interfacial gap formation as a function of the energy dose. *Dental Materials*, v.27, p.1162-1169, 2011.
17. D'alpino P.H.P., Hipolito V.D., Bechtold J., Santos P.J., Alonso R.C.B., Rodrigues F.P., Silikas N. Influence of energy dose on the hardness, depth of polymerization and internal gap formation of methacrylate- and silorane-based restorations. *Dental Materials*, vol.26s, n.1016, 2010.
18. Darmani H. ,Al-Hiyasat A.S., Milhem M.M. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. *Quintessence Int.*, vol.38, p.789-95, 2007.
19. Diniz I. M.A. Avaliação da citotoxicidade da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana sobre culturas de células pulpares *in vitro*. Belo Horizonte, 2011. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais.
20. Duarte JR. S., Botta A.C, Phark J., Sadan A. Selected mechanical and physical properties and clinical application of a new low-shrinkage composite restoration. *Quintessence International*, v.40, p.631-638, 2009.
21. Duarte JR. S., Phark J., Varjão F.M., Sadan A. Nanoleakage, ultramorphological characteristics, and microtensile Bond strengths of a

- new low-shrinkage composite to dentin after artificial aging. *Dental Materials*, vol 25, n.2009, p.589-600, October 2008.
22. Eckert AS., Dede K., Ehbrecht S., Klettke T., Spenkuch A., Stippchild S., Thalacker C., Weinmann W. First cationically curing oxirane based dental filling material. *Polymer Preprints (ACS Div Polym Chem)*, vol. 45, n.2, p.343, 2004.
 23. Eick J.D, Kotha S.P, Chappelow C.C, Kilway K.V, Giese G.J, Glaros A.G, Pinzino C.S. Properties of silorane-based dental resins and composites containing a stress-reducing monomer. *Dental Materials*, v.23, n.1011-7 September.2007
 24. Ergun G., Egilmez F., Cekic-Nagas I. The cytotoxicity of resin composites cured with three light curing units at different curing distances. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, vol.16,p.e252-9, 2011.
 25. Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH, Nelson J. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Archives of Oral Biology* 1985; 30(8):609-613.
 26. Ferracane, J.L.; Condon, J.R. Rate elution of leachable components from composite. *Dent. Mater.*, v.6, n.4, p.282-287, 1990.
 27. Ferracane, J.L.; Greener. Fourier transform Infrared Analysis of Degree of Polymerisation in Unfilled Resins-Methods Comparison. *Dent Res*, v.63, n.7, p.1093-1095, jul 1984.
 28. Franz A., Konig F., Lucas T., Watts D.C., Schedle A. Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. *Dental Materials*, vol.25, p.232-239, 2009.
 29. Furuse A. Y., Gordon K., Rodrigues F. P., Silikas N., Watts D.C. Colour-stability and gloss-retention of silorane and dimethacrylate composites with accelerated aging. *Journal of Dentistry*, v., n.1016, p.1-8, August.2008.
 30. Gauthier M. A., Stangel I., Ellis T. H., Zhu X.X. A new method for quantifying the intensity of the C=C band of dimethacrylate dental monomers in their FTIR and Raman spectra. *Biomaterials*, vol.26, p.6440-6448, 2005.
 31. Geurtsen, W.; Lehmann, F.; Spahl, W. et al. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human

- primary fibroblast cultures. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v.41, n. 3, p.474-480, Sept. 1998.
32. Guggerberger R, Weinmann W. Exploring beyond methacrylates. *Am J Dent*, vol.13(SI), p.82-4, 2000.
33. Hanks C.T., Strawn S.E., Watahai J.C., Craig R.G. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *Journal of Dental Research*, vol.70, 1991.
34. Heil, T.L.; Volkman, K.R.; Wataha, J.C. et al Human peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for in vitro biocompatibility testing of dental material components. *J. Oral Rehab.*, Oxford, v.29, n.5, p.401-407, May, 2002.
35. Huang FM e Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral*
36. Ilie N., Hickel R. Macro-, micro- and nano-mechanical investigations on silorane and methacrylate-based composites. *Dental Materials*, vol.25, n.1016, p.810-819, February 2009.
37. Issa Y., Brunton P., Waters C.M., Watts D.C. Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. *Dental Materials*, vol.24, p.281-287, 2008.
38. Issa Y., Watts D.C., Brunton P.A., Waters C.M., Duxbury A.J. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dental Materials*, vol.20, p.12-20, 2004.
39. Karaoglanoglu S., Akgul N., Orçun Zorba Y., Ozdabak N., Yilmaz S., Unal N., Seven N. Cytotoxicity evaluation of seven different resin based restorative materials: in vitro study. *Materials Research Innovations*, vol.14, n° 3, 2010.
40. Klautau E.B., Carneiro K.K., Lobato M.F., Machado S. M. M., Souza JÚNIOR M. H. S. Low shrinkage composite resins: influence on sealing ability in unfavorable C-factor cavities. *Dental Materials*, v.25, n.1, p.5-12, jan-feb 2011.
41. Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Harréus, U.A. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the

- single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J. Dent.*, v.32, n. 3, p.229-234, 2004.
42. Knezevic A, Tarle Z, Meniga, Utalo JS, Pichler G. Influence of light intensity from different curing units upon composite temperature rise. *J Oral Rehabil*, vol.32, p.362-7, 2005.
43. Kong N., Jiang T., Zhou Z., Fu J. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. *Dental Materials*, vol.25, p.1371-1375, 2009.
44. Leloup G, Holvoet PE, Bebelman S, Devaux J. Raman scattering determination of the depth of cure of light-activated composites: influence of different clinically relevant parameters. *J Oral Rehab*, vol.29, p.510-5, 2002.
45. Leprince J., Palin W. M., Mullier T., Devaux J., Vreven J., Leloup G. Investigation filler morphology and mechanical properties of new low-shrinkage resin composite types. *Oral Rehabilitation*, v., n.1111, p., January.2010.
46. Lewis, J.; Nix, L.; Schuster, G. et al. Response of oral mucosa cells to glass-ionomer cements. *Biomater.*, v.17, n.11, p.1115-1120, 1996.
47. Leyhausen, G.; Abtahi, M.; Karbakhsch, M.; et al. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. *Biomater.*, Guilford, v.19, n.6, p.559-564, Mar. 1998.
48. Li Y., Swartz ML., Phillips RW., Moore BK., Roberts TA. Effect of filler content and size on properties of composites. *J Dent Res*, vol.64, p.1396-401, 1985.
49. MacDougall, M.; Selden, J.K.; Nydegger, J.R. et al. Immortalized mouse odontoblasto cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. *Am J Dent.*, San Antônio, v.11, Issue spc., p.11-16, Jan. 1998.
50. Mendonça, A. A. M. Efeito citotóxico de diferentes materiais dentários sobre células de linhagem odontoblástica. Araraquara, 2005, 123p. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho".

51. Michelsen VB, Lygre H, Ska° Levik R, Tveit AB, Solheim E. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, vol.111, p.263-271, 2003.
52. Moharamzadeh K., Van Noort R., Brook I.M., Scutt A. M. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCat keratinocytes. *Dental Materials*, vol.23, p.40-44, 2007.
53. Monte Alto *et al.* Depth of cure of dental composites submitted to different light-curing modes. *Journal of Applied Science*, v.14, n.12, p.71-76, 2006.
54. Moraes L. G.P., Rocha R.S.F, Menegazzo L.M., Araújo E.B., Yukimitu K., Moraes JC.S. Infrared spectroscopy: a tool for determination of the degree of conversion in dental composites. *J Appl Oral Sci.*,vol.16, p.145-9, 2008.
55. Mundim F. M., Garcia L.F.R., Cruvinel D.R., Lima F.A., Bachmann L., Pires-de Souza F.C.P. Color stability, opacity and degree of conversion of pre-heated composites. *Journal of Dentistry*, vol.395, p.e25-e29, 2011.
56. Nakabayashi, N; Pashley, D. H. *Hibridização dos Tecidos Duros Dentais*. 1.ed. São Paulo: Quintessence, 2000. 107p.
57. Naçaci, A.; Öztan, M.; Yilmaz, S. Cytotoxicity of composite resins polymerized with different curing methods. *Int. Endod. J.*, v.37, n.2, p.151-156, 2004.
58. Palin W.M., Fleming G. J. P., Nathwani H., Burke F. J. T., Randall R.C. In vitro cuspal deflection and microleakage of maxillary premolars restored with novel low-shrink dental composites. *Dental Materials*, vol. 21, n.2005, p.324-335, may 2005.
59. Papadogiannis D., Kakaboura A., Palaghias G., Eliades G. Setting characteristics and cavity adaptation of low-shrinking resin composites. *Dental Materials*, v.25, n.1016, p.1509-1516, june.2009.
60. Park Y.J.; Chae, K.H; Rawls, H.R. Development of a new photoinitiator system for dental light-cure composite resins. *Dent. Mater.*, Copenhagen, v. 15, n. 2 , p. 120-127, Mar.1999.

61. Paul, S.J.; Leach, M.; Rueggerberg, F.A. et al. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *J. Dent.*, v.27, n.3, p.209-214, 1999.
62. Peutzfeldt A, Asmussen E. Hardness of restorative resins: effect of camphorquinone, amine, and inhibitor. *Acta Odontol Scand*, vol.47, p.229-31, 1989.
63. Peutzfeldt, A.; Asmussen, E. Hardness of restorative resins: effect of camphorquinone, amine and inhibitor. *Acta Odontol. Scand.*, Oslo, v. 47, n. 4, p. 229-231, Aug. 1989.
64. Pianelli C, Devaux J, Bebelman S, Leloup G. The micro-Raman spectroscopy, a useful tool to determine the degree of conversion of light-activated composite resins. *J Biomed Mater Res*, vol.48, p.48-62, 1999.
65. Polydorou O., Trittler R., Hellwig E., Kummerer K. Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dental materials*, vol. 23, p.1535-1541, 2007.
66. Price RB, Rueggeberg FA, Labrie D, Felix CM. Irradiance uniformity and distribution from dental light curing units. *J Esthet Restor*, vol 22(2), p.86-101, 2010.
Radiology, and Endodontics 2002; 93(3)361:365.
67. Rahiotis Christos. Degree of Cure and Monomer Leaching from Orthodontic Adhesive Resins: In Vitro and in Vivo Evidence. *Semin Orthod*, vol.16, p.266-273, 2010.
68. Ratanasathien S., Wataha J.C, Hanks C.T. Cytotoxicity interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J. Dent. Res.*, vol.74, p.1602-1606, 1995.
69. Rueggeberg F.A., Hashinger D.T., Fairhurst C.W. Calibration of FTIR conversion analysis of contemporary dental resin composites. *Dental Materials*, vol.6, p.241-249, 1990.
70. Rueggerberg, F.A.; Ergle, J.W.; Lockwood, P.E. Effect of photoinitiator level on properties of a light-cured and post-cure heated model resin system. *Dent. Mater.*, Copenhagen, v. 13, n. 6, p. 360-364, Nov. 1997.

71. Ruyter, I. E.; Oysaed, H. Composites for use in posterior teeth: composition and conversion. *J Biomed Mat Res*, v.21, p.11-23, 1987.
72. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, vol.106, p.696-706, 1998.
73. Schneider L.F.J, Pfeifer C.S.C, Consani S., Prah S.A., Ferracane J.L. Influence of photoinitiator type on the rate of polymerization, degree of conversion, hardness and yellowing of dental resin composites. *Dent Mater*, vol.24, p.1169-77, 2008.
74. Schroeder W.F., Vallo C.I. Effect of different photoinitiator systems on conversion profiles of a model unfilled light-cured resin. *Dent Mater*, vol.23, p.1313-21, 2007.
75. Shin W. S., Li X.F., Schwartz B., Wunder S.L., Baran G.R. Determination of the degree of cure of dental resins using Raman and FT-Raman spectroscopy. *Dent Mater*, vol. 9, p.317-324, 1993.
76. Sigusch B. W., Volpel A., Braun I., Uhl A., Jandt K.D. Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composites. *Dental Materials*, vol.23, p.1342-1348, 2007.
77. Sigusch B.W., Pflaum T., Volpel A., Gretsche K., Hoy S., Watts D.C., Jandt K.D. Resin-composite cytotoxicity varies with shade and irradiance. *Dental Materials*, vol.28, p.312-319, 2012.
78. Silikas N., Eliades G., Watts D.C. Light intensity effects on resin-composite degree of conversion and shrinkage strain. *Dental Materials*, vol.16, p.292-296, 2000.
79. Sjogren G., Sletten G., Dahl J.E. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, vol.84, p.229-36, 2000.
80. Soares L.E., Martin A.A., Barbosa Pinheiro A.L. Degree of conversion of composite resin: a Raman study. *J Clin Laser Med Surg*, vol.21, p.357-62, 2003.
81. Stansbury J.W. Curing dental resins and composites by photopolymerization. *J Esthet Dent*, vol.12, p.300-8, 2000.
82. Sun, G.J.; Chae, K.H. Properties of 2,3-butanedione and 1-phenyl-1,2-propanedione as new photosensitizers for visible light cured dental resin composites. *Polymer*, v. 41, n. 16, p. 6205-6212, 2000.

83. Taira, M. et al. Analysis of photo-initiators in visible-light-cured dental composites resins. *J. Dent. Res.*, Chicago, v. 67, n. 1, p. 24-28, Jan. 1988.
84. Takeda, S; Hashimoto, Y.; Miura, Y.; et al. Cytotoxicity test of dental monomers using serum-free culture (in vitro). *J. Jp. Dent. Mater.* v.12, p. 613-619, 1993.
85. Tang A. T. H., Liu Y., Bjorkman L., Ekstrand J. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, vol.8, p.116-132, 1999.
86. Tarumi H., Torii M., Tsuchitani Y. Relationship between particle size of barium glass filler and water sorption of light-cured composite resin. *Dental Materials Journal*, vol.14, p.37-44, 1995.
87. Tezvergil-Mutluay A., Lassila L.V.J., Vallittu P.K. Incremental layers bonding of silorane composite: The initial bonding properties. *Journal of Dentistry*, vol.36, p.560-563, 2008.
88. Tu MG., Liang WM., Wu TC., Chen SY. Evaluation of cytotoxicity of resin bonding materials toward human oral epithelial cells using three assay systems. *J Dent Sci*, vol.4, p.178-186, 2009.
89. Uhl A., Mills RW., Rzanny AE., Jandt KD. Time dependence of composite shrinkage using halogen and LED light curing. *Dental Materials*, vol.21, p.278-286, 2005.
90. Van Ende A., De Munck J., Mine A., Lambrechts P., Van Meerbeek B. Does a low-shrinking composite induce less stress at the adhesive interface? *Dental Materials*, vol.26, p.215-222, 2009.
91. Volk J., Engelmann J., Leyhausen G., Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, vol.22, p.449-505, 2006.
92. Wei Y., Silikas N., Zhang Z., Watts D.C. Hygroscopic dimensional changes of self-adhering and new resin-matrix composites during water sorption/desorption cycles. *Dental Materials*, vol.27, n.1016, p.259-266, October 2010.
93. Weinmann W., Thalacker C., Guggenberger R. Siloranes in dental composites. *Dental Materials*, v.21, p.68-74, 2005.

94. Weinmann W., Thalacker C., Hoarau-Kurtz M. C., Kappler O. Strain of an experimental silorane flowable and four flowable methacrylates. *Dental Materials*, vol. 26s, n.1016, 2010.
95. Yesilyurt C., Yoldas O., Altintas S. H., Kusgoz A. Effects of food-simulating liquids on the mechanical properties of a silorane-based dental composite. *Dental Materials Journal*, v.28, n.3, p.362-367, 2009.
96. Yoshida, K.; Greener, E.H. Effect of photoinitiator on degree of conversion of unfilled light-cured resin. *J. Dent., Guildford*, v. 22, n.5 , p. 296-299, Oct. 1994.

9. APÊNDICES**APÊNDICE 1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 0570.0.203.000-11

**Interessado(a): Prof. Luiz Thadeu de Abreu Poletto
Departamento de Odontologia Restauradora
Faculdade de Odontologia - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 10 de janeiro de 2012, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da citotoxicidade de uma resina composta a base de Silorano em fibroblastos gengivais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

APÊNDICE 2

Quadro 1: Dados estatísticos do metabolismo celular após o contato com os espécimes incubados por 12 dias. (GraphPad Prism 5.0)

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Z100 20" vs Z100 40"	-8,625	1,595	No	Ns	-27.06 to 9.810
Z100 20" vs Z250 20"	-15,49	2,865	No	Ns	-33.93 to 2.940
Z100 20" vs Z250 40"	-11,14	2,060	No	Ns	-29.58 to 7.293
Z100 20" vs Z350XT 20"	-23,89	4,417	Yes	**	-42.33 to -5.459
Z100 20" vs Z350XT 40"	-17,31	3,200	No	Ns	-35.75 to 1.125
Z100 20" vs P90 20"	-18,64	3,446	Yes	*	-37.07 to -0.2046
Z100 20" vs P90 40"	-12,79	2,364	No	Ns	-31.22 to 5.648
Z100 20" vs FIB.	-28,33	5,237	Yes	***	-46.77 to -9.896
Z100 40" vs Z250 20"	-6,869	1,270	No	Ns	-25.30 to 11.57
Z100 40" vs Z250 40"	-2,517	0,4652	No	Ns	-20.95 to 15.92
Z100 40" vs Z350XT 20"	-15,27	2,823	No	ns	-33.70 to 3.167
Z100 40" vs Z350XT 40"	-8,685	1,605	No	ns	-27.12 to 9.751
Z100 40" vs P90 20"	-10,01	1,851	No	ns	-28.45 to 8.421
Z100 40" vs P90 40"	-4,162	0,7693	No	ns	-22.60 to 14.27
Z100 40" vs FIB.	-19,71	3,643	Yes	*	-38.14 to -1.270
Z250 20" vs Z250 40"	4,353	0,8047	No	ns	-14.08 to 22.79
Z250 20" vs Z350XT 20"	-8,399	1,553	No	ns	-26.83 to 10.04
Z250 20" vs Z350XT 40"	-1,815	0,3355	No	ns	-20.25 to 16.62
Z250 20" vs P90 20"	-3,145	0,5814	No	ns	-21.58 to 15.29
Z250 20" vs P90 40"	2,708	0,5006	No	ns	-15.73 to 21.14
Z250 20" vs FIB.	-12,84	2,373	No	ns	-31.27 to 5.599
Z250 40" vs Z350XT 20"	-12,75	2,357	No	ns	-31.19 to 5.683
Z250 40" vs Z350XT 40"	-6,168	1,140	No	ns	-24.60 to 12.27
Z250 40" vs P90 20"	-7,498	1,386	No	ns	-25.93 to 10.94
Z250 40" vs P90 40"	-1,645	0,3041	No	ns	-20.08 to 16.79
Z250 40" vs FIB.	-17,19	3,178	No	ns	-35.62 to 1.246
Z350XT 20" vs Z350XT 40"	6,584	1,217	No	ns	-11.85 to 25.02
Z350XT 20" vs P90 20"	5,254	0,9713	No	ns	-13.18 to 23.69
Z350XT 20" vs P90 40"	11,11	2,053	No	ns	-7.328 to 29.54
Z350XT 20" vs FIB.	-4,437	0,8203	No	ns	-22.87 to 14.00
Z350XT 40" vs P90 20"	-1,330	0,2458	No	ns	-19.76 to 17.11
Z350XT 40" vs P90 40"	4,523	0,8362	No	ns	-13.91 to 22.96
Z350XT 40" vs FIB.	-11,02	2,037	No	ns	-29.46 to 7.414
P90 20" vs P90 40"	5,853	1,082	No	ns	-12.58 to 24.29
P90 20" vs FIB.	-9,691	1,792	No	ns	-28.13 to 8.744
P90 40" vs FIB.	-15,54	2,874	No	ns	-33.98 to 2.891

APÊNDICE 3

Quadro 2: Dados estatísticos do metabolismo celular após o contato com os espécimes incubados por 24 horas. (GraphPad Prism 5.0)

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	T	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff	
Z100 20" vs Z100 40"	1,517	0,3513	No	ns	-13.20 to 16.24	
Z100 20" vs Z250 20"	-5,912	1,369	No	ns	-20.63 to 8.807	
Z100 20" vs Z250 40"	-16,57	3,836	Yes	*	-31.28 to -1.847	
Z100 20" vs Z350XT 20"	-12,15	2,814	No	ns	-26.87 to 2.567	
Z100 20" vs Z350XT 40"	-18,47	4,278	Yes	**	-33.19 to -3.756	
Z100 20" vs P90 20"	-17,78	4,117	Yes	**	-32.50 to -3.060	
Z100 20" vs P90 40"	-18,55	4,294	Yes	**	-33.26 to -3.828	
Z100 20" vs FIB.	-16,89	3,912	Yes	*	-31.61 to -2.175	
Z100 40" vs Z250 20"	-7,429	1,720	No	ns	-22.15 to 7.289	
Z100 40" vs Z250 40"	-18,08	4,187	Yes	**	-32.80 to -3.364	
Z100 40" vs Z350XT 20"	-13,67	3,165	No	ns	-28.39 to 1.050	
Z100 40" vs Z350XT 40"	-19,99	4,629	Yes	**	-34.71 to -5.273	
Z100 40" vs P90 20"	-19,30	4,468	Yes	**	-34.01 to -4.577	
Z100 40" vs P90 40"	-20,06	4,646	Yes	**	-34.78 to -5.345	
Z100 40" vs FIB.	-18,41	4,263	Yes	**	-33.13 to -3.692	
Z250 20" vs Z250 40"	-10,65	2,467	No	ns	-25.37 to 4.064	
Z250 20" vs Z350XT 20"	-6,240	1,445	No	ns	-20.96 to 8.478	
Z250 20" vs Z350XT 40"	-12,56	2,909	No	ns	-27.28 to 2.156	
Z250 20" vs P90 20"	-11,87	2,748	No	ns	-26.58 to 2.852	
Z250 20" vs P90 40"	-12,63	2,925	No	ns	-27.35 to 2.084	
Z250 20" vs FIB.	-10,98	2,543	No	ns	-25.70 to 3.737	
Z250 40" vs Z350XT 20"	4,414	1,022	No	ns	-10.30 to 19.13	
Z250 40" vs Z350XT 40"	-1,909	0,4420	No	ns	-16.63 to 12.81	
Z250 40" vs P90 20"	-1,213	0,2808	No	ns	-15.93 to 13.51	
Z250 40" vs P90 40"	-1,980	0,4586	No	ns	-16.70 to 12.74	
Z250 40" vs FIB.	-0,3279	0,07593	No	ns	-15.05 to 14.39	
Z350XT 20" vs Z350XT 40"	-6,323	1,464	No	ns	-21.04 to 8.395	
Z350XT 20" vs P90 20"	-5,627	1,303	No	ns	-20.34 to 9.091	
Z350XT 20" vs P90 40"	-6,394	1,481	No	ns	-21.11 to 8.324	
Z350XT 20" vs FIB.	-4,742	1,098	No	ns	-19.46 to 9.976	
Z350XT 40" vs P90 20"	0,6960	0,1612	No	ns	-14.02 to 15.41	
Z350XT 40" vs P90 40"	-	0,07166	0,01659	No	ns	-14.79 to 14.65
Z350XT 40" vs FIB.	1,581	0,3661	No	ns	-13.14 to 16.30	
P90 20" vs P90 40"	-0,7677	0,1778	No	ns	-15.49 to 13.95	
P90 20" vs FIB.	0,8849	0,2049	No	ns	-13.83 to 15.60	
P90 40" vs FIB.	1,653	0,3827	No	ns	-13.07 to 16.37	

APÊNDICE 4

Quadro 3: Média do grau de conversão (% DC) dos compósitos fotopolimerizados por 20 e 40 segundos.

Compósito	Tempo pol.	DC%
Z100	20 s	62,9
Z100	40 s	68,5
Z250	20 s	60,1
Z250	40 s	57,2
Z350	20 s	60,7
Z350	40 s	59,2
Silorano	20 s	81,7
Silorano	40 s	87,0