



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EFEITO DA VARIAÇÃO DE MONÓMEROS FUNCIONAIS NA
FORMULAÇÃO DE NOVAS RESINAS AUTO-ADESIVAS:
ESTUDO DE CITOTOXICIDADE**

Trabalho submetido por
Marta Freire Neves dos Santos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2022



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EFEITO DA VARIAÇÃO DE MONÓMEROS FUNCIONAIS NA
FORMULAÇÃO DE NOVAS RESINAS AUTO-ADESIVAS:
ESTUDO DE CITOTOXICIDADE**

Trabalho submetido por
Marta Freire Neves dos Santos
para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Dentária**

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Mano Azul
e coorientado por
Prof. Doutor António Sales Delgado

setembro de 2022

Dedicatória

À minha querida Avó Néné,

Agradecimentos

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, pelos últimos 5 anos de constante aprendizagem. À Prof. Doutora Ana Mano Azul, pela sua boa disposição constante e pelo exemplo que representa para mim de motivação e dedicação aos seus alunos. Obrigada pela sua disponibilidade e apoio durante o curso.

Ao Prof. Doutor António Delgado, obrigada por me motivares a dar o melhor de mim e pelo apoio constante e incansável durante este último ano e meio. És um exemplo como profissional pelo teu inesgotável empenho e resiliência, mas acima de tudo, como ser humano e amigo.

Ao Prof. Doutor Miguel Marto, obrigada pelo seu enorme apoio e disponibilidade.

Ao Prof. Doutor Mário Polido, pela disponibilidade de todos os materiais necessários. Obrigada pela ajuda.

À querida Inês, que tornou cada ida a Coimbra numa viagem mais leve. Obrigada por me ensinares tanto sobre investigação celular e pelas horas que despendeste para me ajudar com infinita paciência.

Aos meus pais, que durante 5 anos encurtaram a distância e estiveram sempre tão perto. Obrigada pela motivação constante e por estarem presentes em cada conquista da minha vida. São a minha maior fonte de inspiração.

Aos meus irmãos, Tomás e Vera, que tenhamos sempre a mesma união e que continuemos a celebrar juntos cada vitória.

Ao Gonçalo, o meu companheiro de todas as horas. Obrigada pela paciência, apoio incondicional e por me fazeres sempre acreditar que sou capaz.

À minha amiga Tere, que me ensinou que ainda se fazem amizades para a vida na faculdade. Obrigada pelo apoio constante e pelas gargalhadas descontroladas de todos os dias. Sem ti, não teria conseguido.

Ao meu amigo Jomi, por todos os dias e noites de estudo com pausas a rir até ir às lágrimas.

À minha Martita AP, obrigada por cada momento inesquecível. Que seja sempre assim.

À minha parceira de box e amiga Martinha, obrigada pela tua dedicação e amizade.

Aos meus queridos amigos da faculdade Inês, Magali, Zim, Miguel e Vicente. Obrigada por tantos bons momentos ao longo destes 5 anos.

Às minhas amigas da vida toda Inês, Maria, Carol e Mariana. Obrigada por crescerem comigo ao longo de quase 20 anos. Adoro-vos para sempre.

Resumo

Introdução: Avaliar e comparar a citotoxicidade de resinas compostas auto-adesivas experimentais, formuladas com diferentes monómeros funcionais, pelo método indireto de extrato, às 24 horas, utilizando células do tipo pré-odontoblásticas (MDPC-23).

Métodos: Para o presente estudo foram formuladas 5 resinas auto-adesivas, com variação do monómero funcional adesivo/surfactante. A mistura de resina líquida consistiu em dimetacrilato de uretano (UDMA) a 60 wt%, com adição de 24 wt% de dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) como diluente. Em 4 dos 5 grupos experimentais foram adicionados 10 wt% de diferentes monómeros funcionais: 10-MDP, GPDM, HEAA e HEMA. A última formulação, de controlo, teve 10 wt% adicionais de UDMA, sem monómero funcional. Foi adicionado ainda 1% de canforoquinona à fase líquida. A fase particulada incluiu vidros de bário e aluminossilicatos (1,5 µm e 0,4 µm) e nanopartículas de sílica. Os compósitos foram misturados numa proporção pó-líquido de 1.2:1, com recurso a uma misturadora centrífuga. Cada resina foi introduzida em anéis de silicone do tipo O-Ring de dimensões padronizadas, procedendo-se de seguida à polimerização de 8 discos de resina por grupo experimental. Os discos foram esterilizados com recurso a radiação UV, tendo sido subsequentemente introduzidos no condicionamento de meio celular numa proporção de 1:1 (incubação 24 horas sob agitação). Foi utilizada uma cultura celular do tipo pré-odontoblastos (MDPC-23) num ensaio de citotoxicidade de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-Difenil Tetrazolium (MTT) realizado 24h após a exposição das células aos extratos em diferentes concentrações, tendo sido posteriormente calculada a viabilidade celular.

Resultados: Foram registadas diferenças entre os grupos estudados em concentrações abaixo de 100% (50, 25, 12,5 e 6,25%) e entre os grupos experimentais contendo HEMA e HEAA como monómeros funcionais.

Conclusões: Todas as resinas auto-adesivas testadas demonstraram desencadear respostas de citotoxicidade, em concentrações elevadas, 24 horas após a administração dos extratos, sendo que este nível de toxicidade varia em função da formulação.

Palavras-chave: monómero funcional, auto-adesiva, resina composta, citotoxicidade.

Abstract

Introduction: To evaluate and compare the cytotoxicity of experimental self-adhesive compounds, formulated with different functional monomer resins, by the indirect extractor method, at 24h, using pre-odontoblast cells (MDPC-23).

Methods: For the present study, 5 different self-adhesive resins were formulated, with a set of adhesive/surfactant monomer. The liquid blend resin included 60 wt% urethane dimethacrylate (UDMA), combined with 24 wt% of triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) as a diluent. In 4 of the 5 experimental groups, 10 wt% was composed by a different functional monomer: 10-MDP, GPDM, HEAA and HEMA. The last formulation, the control group, had an additional 10 wt% of UDMA, not containing a functional monomer. A further 1wt% of camphorquinone was added to the liquid phase. The particulate phase included barium and aluminosilicate glasses (1.5 μm and 0.4 μm) and silica nanoparticles. The composites were blended in a 1.2:1 powder-to-liquid ratio using a centrifugal mixer (45 s, 1500 rpm). Each resin was then introduced in silicone rings, being then polymerized and producing 8 discs per group. The discs were sterilized using UV radiation and were subsequently introduced into the cell medium conditioning at a ratio of 1:1 (24 hours incubation under agitation). A pre-odontoblast-type cell culture (MDPC-23) was used in an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cytotoxicity assay performed 24h after cell exposure to the extracts at different concentrations. Cell viability was subsequently calculated.

Results: Differences were only registered for concentrations below 100% (50, 25, 12.5 and 6.25%) and between the experimental groups containing HEMA and HEAA.

Conclusions: All the self-adhesive resins tested showed to be cytotoxic, in high concentrations, 24 hours after cell exposure to the extracts, varying with the different formulations.

Key words: functional monomer, self-adhesive, composite, cytotoxicity.

Índice

I. Introdução	15
1. Materiais Restauradores Diretos Atuais	15
1.1 Sistemas adesivos	15
1.2 Adesão aos substratos dentários	16
1.3 Resinas compostas	19
1.4 Resinas Compostas Auto-adesivas	21
2. Limitações das Resinas Compostas Atuais	22
2.1 Polimerização	23
2.2 Degradação	25
2.3 Procura por Bioatividade	25
2.4 Toxicidade	27
3. Ensaio de Citotoxicidade	29
3.1 Ensaio de MTT e Regulamentação ISO	29
4. Enquadramento	30
II. Objetivos do Estudo.....	33
III. Hipóteses do Estudo.....	33
IV. Materiais e Métodos	35
1. Amostra de Estudo.....	35
1.1 Formulação das Resinas Compostas Auto-adesivas.....	35
1.2 Confeção dos discos de resina auto-adesiva.....	37
1.3 Preparação dos Discos e Obtenção dos Extratos	38
2. Cultura Celular.....	40
3. Materiais	42
4. Incubação Celular e Ensaio de MTT	43
4.1 Incubação Celular com os Extratos de Resina.....	43
5. Avaliação da atividade metabólica	43
6. Observação de imagens com recurso a microscopia eletrónica de varrimento....	44
7. Análise estatística	48
V. Resultados.....	49
1. Ensaio de MTT	49
2. Valores de pH.....	51
3. Microscopia eletrónica de varrimento (MEV)	52

VI. Discussão.....	55
VII. Conclusão	61
VIII. Relevância clínica	61
IX. Perspetivas Futuras	63
X. Bibliografia	65

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo das estratégias adesivas etch and rinse e self etch. .	18
Figura 2. Estrutura química de monómeros utilizados nos adesivos dentários comerciais. Adaptado de Delgado (2021).....	20
Figura 3. Etapas de polimerização sofridas por metacrilatos à base de resina usados em medicina dentária. (Young & Novel,1991). Adaptado de Delgado (2021)	24
Figura 4. Esquema representativo da confeção de resinas compostas auto-adesivas	36
Figura 5. Confeção de discos de resina	37
Figura 6. Esquema ilustrativo do protocolo de polimerização de discos de resina auto-adesiva	38
Figura 7. Aparelho de Esterilização UV- Ultragen, Viseu, Portugal.....	38
Figura 8. Meios condicionados com discos de resina auto-adesiva	39
Figura 9. Esquema representativo da diluição dos extratos	39
Figura 10. Imagem microscópica de células MDPC-23 em suspensão.	40
Figura 11. Placas de cultura celular.	41
Figura 12. Administração dos extratos em diferentes concentrações nas células MDPC-23.	43
Figura 13. Placas de cultura com células MDPC-23 após adição de MTT	43
Figura 14. Esquema representativo do ensaio de MTT	44
Figura 15. Esquema ilustrativo do protocolo de fixação das células nos discos de resina.	45
Figura 16. Esquema ilustrativo do protocolo de desidratação das amostras.....	46
Figura 17. Discos de resina cobertos com ouro e paládio.	46
Figura 18. Máquina de evaporação a vácuo JEE-400.....	47
Figura 19. Microscópio eletrónico de varrimento- JEOL JSM 5400.	47
Figure 20. Imagens obtidas através da observação com recurso a um microscópio eletrónico de varrimento.	53

Índice de Tabelas

Tabela 1. Materiais utilizados – composição e especificações técnicas42

Tabela 2. Valores de pH do meio DMEM não condicionado e em cada grupo de extratos de resina auto-adesiva em cada uma das concentrações estudadas51

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Atividade metabólica, em percentagem, resultante dos resultados do ensaio de MTT, dividido pela concentração dos extratos, permitindo uma rápida comparação entre grupos. Foram observadas diferenças em concentrações $\leq 50\%$ (Bonferroni post-hoc). As barras de erro constituem erro padrão da média	49
Gráfico 2. A linha de tendência para cada concentração, que demonstra valores de atividade metabólica mais elevados em concentrações mais diluídas de extratos de discos de resina	50

Lista de Siglas

4-META – 4-Metacriloxietil-Trimelitato-Anidrido

10-MDP – 10-Metacriloiloxidecil Dihidrogeno Fosfato

ANOVA - *Analysis of Variance*

BaG - Vidro de bário

Bis-GMA- Dimetacrilato de Bisfenol A-glicidil

Bis-EMA - Dimetacrilato de Bisfenol-A-Etoxilato

CFQ - Canforoquinona

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EDTA - Ácido Etilenodiamina Tetra-Acético

FBS - Soro Fetal de Bovino

GPDM - Glicerol-Fosfato dimetacrilato

HDP-10 - Hidroxidecil Dihidrogenofosfato

HEAA - Hidroxietil Acrilamida

HEMA - Hidroxietil Metacrilato

HL-60 - Linha Celular Leucémica Promielocítica Humana

ISO - International Organization for Standardization

MA – Ácido Metacrílico

MEV - Microscopia Eletrônica de Varrimento

MDPC-23 - *Fetal Mouse Dental Papilla Cell-23*

MTT - [3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl) -2,5-Difenil Tetrazolium]

PBS - Tampão Fosfato-Salino

TEGDMA – Dimetacrilato de Trietilenoglicol

UDMA – Dimetacrilato de Uretano

wt%- Percentagem em Peso

I. Introdução

1. Materiais Restauradores Diretos Atuais

Atualmente, a medicina dentária tem vindo a assistir a uma crescente procura por investigação atual que contribua para o progresso da qualidade e aplicação de materiais restauradores diretos (Pfeifer, 2017). De facto, atualmente, existe uma enorme variedade de materiais usados com fins restauradores, incluindo: resinas compostas, cimentos de ionómero de vidro ou ionómero de vidro modificado por resina, compómeros ou ainda a amálgama dentária (Manhart et al., 2001). Uma grande mudança neste campo foi introduzida após a Convenção de Minamata em 2013 (Khangura et al., 2018). Esta declarou a necessidade de redução de aplicação de amálgamas como material restaurador, devido à libertação de mercúrio presente na sua composição (aproximadamente 50%), deixando assim de ser uma opção restauradora viável. Com isto acresceu a preocupação e procura por materiais dentários biocompatíveis, bem como pela prevenção de doenças causadas por materiais com características prejudiciais ao ser humano (Fisher et al., 2018). As resinas compostas passaram, desta forma, a ser consideradas como os materiais restauradores diretos de eleição (Nascimento et al., 2013), enaltecidos também pelas suas excelentes propriedades óticas e boas propriedades mecânicas, promovendo os tratamentos minimamente invasivos (Demarco et al., 2017).

Desta forma, é importante reiterar que a dentisteria moderna e minimamente invasiva, preconiza procedimentos que devolvem e restauram corretamente a forma, função e estética com recurso a remoção mínima de estrutura dentária (Malterud, 2006).

1.1 Sistemas adesivos

Os materiais restauradores à base de resina beneficiam de mecanismos de adesão para garantir a união ao substrato, que poderá ser esmalte ou dentina. Daí surge a necessidade de recorrer a sistemas adesivos aquando do procedimento restaurador (Van Meerbeek et al., 2003). O conceito geral de adesão é baseado na interação inter-molecular entre dois materiais, atingindo-se a partir da formação de uma interface adesiva (Yoshihara et al., 2013).

Assim, os sistemas adesivos dentários apresentam-se como soluções líquidas, monoméricas, que contêm um ou mais solventes, que poderão ser dispersas em partículas inorgânicas de carga (Peumans et al., 2014). Estes são aplicados sobre um substrato dentário, que pode ser esmalte, dentina, ou, em raros casos, cimento, ficando em contacto com o material restaurador no lado oposto, e permitindo assim a sua adesão (Perdigão, 2007).

1.2 Adesão aos substratos dentários

Contudo, para melhor se compreender como se dá a adesão dentária, é necessário rever a distinção de comportamento adesivo no esmalte e na dentina - os tecidos mineralizados sobre os quais geralmente se adere.

O esmalte é um substrato tendencialmente desidratado, rico em matéria inorgânica, sendo constituído por 96 wt. %, 1 wt. % matriz orgânica, e 3 wt. % água. A adesão de resinas à base de metacrilato ao esmalte é altamente previsível na maioria dos procedimentos restauradores adesivos (Perdigão, 2020), graças ao mecanismo de adesão micromecânica proporcionada pela criação de micro e macroporosidades. Estas são geradas pela desmineralização da superfície do esmalte, geralmente por intermédio de um ácido, permitindo a infiltração de *tags* e *microtags* de resina (Lührs et al., 2008). Assim sendo, a técnica de eleição de adesão ao esmalte assenta num condicionamento ácido prévio da superfície dentária, permitindo a criação de porosidades e posterior substituição do conteúdo mineral, inorgânico, perdido ou retirado dos tecidos dentários, por monómeros de resina, que beneficiam de adesão micromecânica garantida pelo preenchimento das tais porosidades (Peumans et al., 2005).

A dentina é uma estrutura altamente mineralizada, mas com menor conteúdo mineral em comparação com o esmalte (70 wt. %), possuindo, no entanto, uma percentagem bastante superior em água e matéria orgânica (20 wt. %), na sua maioria fibras de colagénio tipo I, o que torna este substrato particularmente desafiante para o processo de adesão (Tjäderhane et al., 2015).

Quando a estrutura dentária é preparada com instrumentos rotatórios ou manuais, os remanescentes de dentina, esmalte e cimento são depositados sobre a dentina formando uma camada amorfa, a *smear layer*. Esta camada é composta por hidroxiapatite, colagénio desnaturado, microorganismos, saliva e fragmentos dos instrumentos rotatórios (Özcan & Volpato., 2020).

A utilização de resinas hidrofóbicas aliada ao elevado conteúdo em água e matéria orgânica presente na dentina, e posterior formação desta *smear layer*, resultante da preparação da cavidade, que culmina na obstrução dos túbulos dentinários, dificulta a capacidade e resposta adesiva neste substrato (Sofan et al., 2017). Desta forma, o principal desafio dos sistemas adesivos é obter uma adesão eficiente e semelhante em ambos os tecidos duros dentários (Van Meerbeek et al., 2010).

É importante distinguir a existência de dois grupos principais, clássicos, de sistemas adesivos, aplicados consoante a sua interação com a *smear layer*: os sistemas *etch-and-rinse e self-etch* (Figura 1). A técnica adesiva *etch-and-rinse* contempla a aplicação de ácido ortofosfórico, num primeiro passo, em separado, para uma completa remoção da *smear layer* e da hidroxiapatite superficial, seguido da aplicação do *primer* e adesivo (ou *bond*), em separado ou em conjunto (Ermis et al., 2010). Assim, estes sistemas adesivos poderão ser de 3 passos (ácido + *primer* + adesivo) ou de dois passos (ácido + *primer/adesivo*) (Pashley et al., 2011).



Figura 1. Esquema representativo das estratégias adesivas *etch and rinse* e *self-etch*.

O conceito *self-etch* surgiu há mais de 25 anos na tentativa de simplificar mais ainda a técnica, através da criação de um *primer* ácido, à base de monómeros com grupos químicos terminais ácidos ou outros componentes ácidos, que baixam o pH da solução e a tornam capaz de desmineralizar a superfície dentária (Giannini et al., 2015). Assim sendo, e apesar dos estudos clínicos atribuírem consistentemente melhores resultados em restaurações em esmalte com o sistema *etch-and-rinse* (Lührs et al., 2008), os sistemas adesivos *self-etch* rentabilizam o tempo de trabalho do operador (menos passos e menor tempo de aplicação) (Van Meerbeek et al., 2011), tendo também um importante papel na redução da sensibilidade pós-operatória, não completamente corroborada, mas teorizada por vários autores (Unemori et al., 2004; Perdigão et al., 2003; Sancakli et al., 2014).

Para além destas estratégias, em 2000, após o término da patente do 10-metacrilóiloxidecil dihidrogenofosfato (10-MDP), pela Kurakay, passou a ser possível desenvolver e sintetizar monómeros ácidos nas várias casas comerciais (Dressano et al., 2020). Assim, surgiu uma nova geração de sistemas adesivos com o intuito de simplificar significativamente os protocolos adesivos: os sistemas adesivos universais ou multi-modo. Estes sistemas adesivos foram concebidos sobre o conceito *all-in-one*, tornando

possível simplificar o processo de adesão com a utilização de um só frasco (Hayashi, 2020). Estes adesivos apelidam-se de multi-modo pois podem ser aplicados recorrendo a qualquer uma das diferentes técnicas adesivas, incluindo: *etch-and-rinse*; *self-etch*, ou ainda, a técnica de condicionamento ácido seletivo do esmalte, em função do substrato (Nagarkar et al., 2019).

Sendo biomateriais em contacto direto com os tecidos orais, e em proximidade com o complexo pulpar, é pertinente analisar a biocompatibilidade dos adesivos dentários (Wawrzynkiewicz et al., 2020). Segundo Wegehaupt et al. (2016), a polimerização incompleta dos adesivos dentários, leva a existência de monómeros residuais remanescentes. A difusão de monómeros residuais pelos túbulos dentinários pode provocar a afeção da polpa dentária em concentrações consideradas tóxicas para as células pulpares (Ergün et al., 2007).

1.3 Resinas compostas

Uma vez que se fala sobre materiais restauradores diretos, a seguir aos sistemas adesivos geralmente contempla-se a aplicação de uma resina composta, numa restauração dentária tradicional. Na ciência dos materiais, o termo “compósito” corresponde a uma mistura física entre, pelo menos, duas fases distintas num único material (Bayne, 2019). Tal facto é o que se observa nas resinas compostas dentárias, que são materiais de restauração que integram uma matriz orgânica e uma matriz inorgânica, unidas por uma interfase, restabelecendo a função dentária e estética (Baldion et al., 2021). A sua matriz orgânica é geralmente composta por monómeros de metacrilato ou oligómeros polimerizáveis, um sistema fotoiniciador que permite a ativação da polimerização por luz, estabilizadores, corantes e compostos potenciadores de brilho. Possuem ainda uma matriz com elevado teor em partículas de carga inorgânica (Moszner & Hirt, 2012). Esta última matriz é geralmente composta por vidros de silicato e pode estabelecer uma ligação à fase monomérica através de organossilanos – comumente utilizados como agentes de união.

De modo a explicar a matriz orgânica dos materiais restauradores poliméricos, é necessário rever a constituição monomérica. Os monómeros utilizados tanto em sistemas adesivos como em resinas compostas dentárias, são monómeros de metacrilato. De

acordo com a sua classificação, poderão ser agrupados em monómeros de reticulação, ou monómeros não reticuláveis (Figura 2).

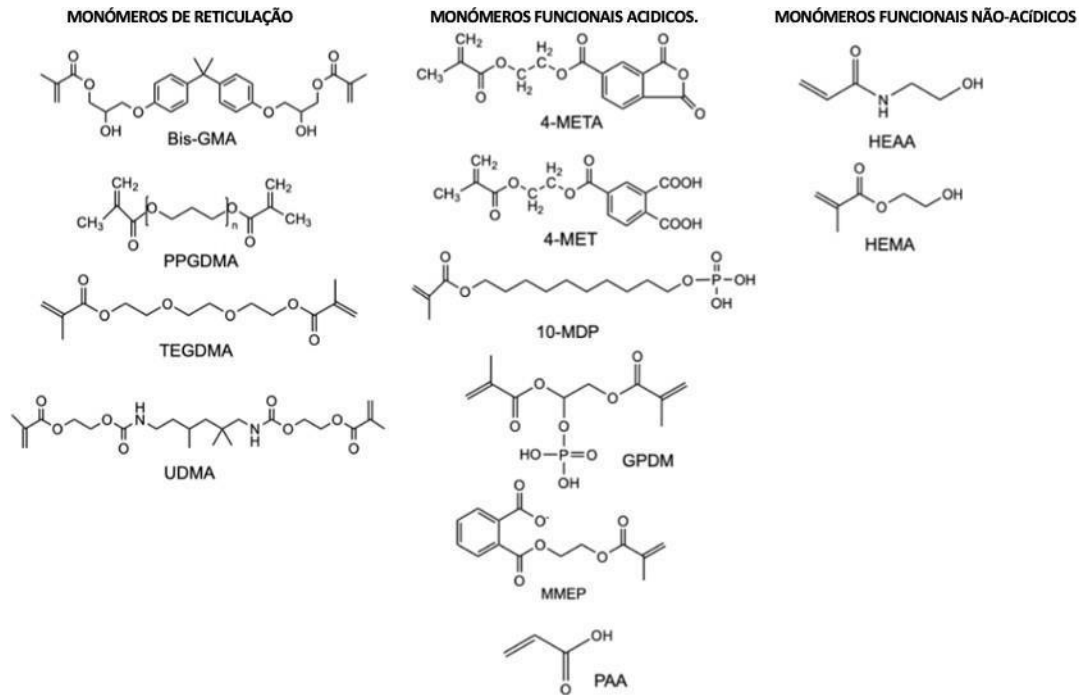


Figura 2. Estrutura química de monómeros utilizados nos adesivos dentários comerciais. Adaptado de Delgado (2021).

Os monómeros de reticulação ou de *cross-linking* são monómeros tendencialmente hidrofóbicos que possuem dois grupos polimerizáveis metacrilato, conseguindo formar cadeias nos dois lados e conseqüentemente formar ligações cruzadas entre as cadeias (Asmussen & Peutzfeldt, 2001), fornecendo resistência mecânica, estabilidade e compatibilidade entre o sistema adesivo e a resina restauradora ou cimento (Moszner et al., 2005). São exemplos de monómeros de reticulação o Dimetacrilato de Bisfenol A-Glicidil (bis-GMA), o Dimetacrilato de Trietilenoglicol (TEGDMA), o Dimetacrilato de Uretano (UDMA) e o Dimetacrilato de Bisfenol-A-Etoxilato (Bis-EMA) (Bedran-Russo et al., 2017). Estes monómeros são utilizados como base de materiais dentários, devido à resistência que conferem à mistura.

Por outro lado, os monómeros funcionais são geralmente monómeros hidrofílicos e possuem um grupo funcional e um grupo polimerizável metacrilato, formando ligações

poliméricas de cadeia linear (Van Landuyt et al., 2007) e facilitando a infiltração da mistura monomérica, por exemplo, na matriz de colagénio exposta aquando da preparação dentinária (Malacarne et al., 2006). São exemplos de monómeros funcionais o hidroxietil metacrilato (HEMA), o 10-MDP, e o hidroxietil acrilamida (HEAA) (Bedran-Russo et al., 2017). Estes monómeros não são, na sua maioria, reticuláveis, à exceção do GPDM, por possuir dois grupos metacrilato.

Uma classificação mais recente baseia-se na afinidade dos monómeros com a água, considerando como monómeros hidrofílicos os monómeros com maior afinidade, tais como o hidroxietil-metacrilato (HEMA) e como hidrofóbicos os monómeros que se dissolvem em solventes orgânicos não aquosos, como o Bisfenol-A-glicidil-dimetacrilato (Bis-GMA) (Pagano et al., 2019).

Assim, temos que a matriz orgânica dos materiais à base de resina é, frequentemente, constituída por monómeros de reticulação viscosos tais como o Bis-GMA ou o UDMA. Geralmente para controlar a viscosidade, é adicionado TEGDMA como diluente. É comum ter-se também monómeros hidrofílicos como o monómero funcional não-acídico HEMA. Devido ao mecanismo de polimerização de radicais livres por adição, parte destes monómeros não polimerizam na totalidade, libertando-se dos compostos resinosos (Schneider et al., 2019). Segundo Bakopoulou et al. (2009), ao entrarem em contacto com os tecidos orais, estes monómeros causam toxicidade local e sistémica, reações pulpares e alérgicas.

1.4 Resinas Compostas Auto-adesivas

A sensibilidade das técnicas adesivas atualmente utilizadas (Vichi et al., 2013), a procura por sistemas adesivos que permitissem uma adesão mais eficiente e rápida, em substratos mais desafiantes e com menor probabilidade de introdução de erros (Rengo et al., 2012), tornou pertinente a necessidade de acoplar os benefícios da adesão aos compósitos restauradores, dando origem a uma nova tecnologia restauradora de resinas compostas auto-adesivas (Van Meerbeek et al., 2020). Estes novos materiais restauradores assentam no conceito que pressupõe a eliminação da necessidade de aplicação de um sistema adesivo em separado, simplificando o protocolo de restauração direta (Vichi et al., 2013).

A capacidade auto-adesiva destes materiais prende-se com a presença de monómeros acídicos, adesivos e funcionais, na sua composição química, como o GPDM, 10-MDP ou o 4-Metacriloxietil-Trimelitato-Anidrido (4-META), mediando a adesão aos tecidos duros dentários (Çelik et al., 2015). As resinas compostas auto-adesivas *flowable* são atualmente indicadas na aplicação de selantes, como base/*liner* e na restauração de pequenas cavidades, sendo a sua aplicabilidade semelhante à apresentada pelas resinas fluidas convencionais (Vichi et al., 2013).

Atualmente, existem no mercado duas alternativas de resinas compostas auto-adesivas *flowable*, disponíveis para uso clínico: *Vertise™ Flow* (Kerr, EUA), *Constic* (DMG, Alemanha) e, mais recentemente, uma resina modificada por poliácidos - a *Surefil One* (Dentsply, Alemanha). Ao excluírem a necessidade de aplicação passo-a-passo do um sistema adesivo, os compósitos auto-adesivos reduzem o risco de contaminação, tornando o processo de adesão mais eficiente e evitando, desta forma, eventos de *overdrying e over-wetting* (Tay et al., 2005).

Devido ao elevado interesse clínico em procedimentos restauradores simplificados com materiais auto-adesivos, torna-se pertinente o seu estudo aprofundado, uma vez que ainda existem poucas tentativas de otimização das suas propriedades nos últimos anos (Manso & Carvalho, 2017).

2. Limitações das Resinas Compostas Atuais

Apesar dos comprovados benefícios do uso das resinas compostas atuais como materiais restauradores diretos, existem ainda diversas limitações neste procedimento restaurador. Os principais motivos de falha de restaurações posteriores a resina composta, incidem no aparecimento de lesões de cárie secundária e/ou fratura do dente ou restauração (Opdam et al., 2014). De facto, por um lado, Spencer et al. (2010) apelidou a camada híbrida formada por materiais poliméricos como o elo mais fraco do complexo restaurador, sofrendo degradação e estando sujeita a fenómenos de nano- ou microinfiltração (Zhang et al., 2012). Por outro lado, estudos clínicos a curto e longo prazo consideram a fratura como um dos maiores fatores de fracasso em restaurações

anteriores e posteriores a resina composta (Demarco, 2017). A técnica adesiva escolhida reforça o complexo resina-substrato, reduzindo o risco de fratura de restaurações diretas (Perdigão et al., 2020).

Por serem materiais poliméricos, vários estudos têm demonstrado também que, quando as resinas não são convenientemente polimerizadas, estas libertam monómeros livres não reagidos, exercendo efeitos tóxicos sobre as células epiteliais e fibroblastos circundantes (Tseng et al., 2007). A libertação de monómeros não reagidos está também frequentemente associada a necrose e inflamação pulpar e periodontal (Cooper et al., 2010).

2.1 Polimerização

Como referido anteriormente, as resinas compostas são constituídas por monómeros que são convertidos em polímeros durante uma reação de polimerização (Kundie et al., 2018). Assim, o processo de polimerização das resinas compostas envolve uma reação entre radicais livres, permitindo a passagem do material de um estado viscoso para o estado rígido (Noronha Filho et al., 2010). As resinas compostas atualmente disponíveis no mercado são, na sua grande maioria, fotopolimerizáveis, isto é, apresentam na sua composição geradores de radicais livres (foto-iniciadores), que são ativados através de fótons, durante a propagação da luz, por um fotopolimerizador de luz azul (Al-Ahdal et al., 2014).

Como explicado por Fugoli & Pfeifer (2017), a reação de polimerização (Figura 3) é constituída por três etapas:

1. Iniciação: Para iniciar a reação, a maioria dos polímeros dentários requer ativação por luz. A luz decompõe o iniciador, que gera radicais livres. Esses radicais livres interagem com os monómeros, quebrando as ligações duplas (C=C) do grupo vinil, tornando-as numa ligação simples (C-C), capaz de co-polimerizar com outras ligações simples.

2. Propagação: O complexo radical livre-monómero formado age como um novo radical livre quando se aproxima de outro monómero para formar um dímero, que também

se torna um radical livre. Estas espécies reativas, por sua vez, podem adicionar um grande número de moléculas de etileno à cadeia, de modo que o processo de polimerização continue através da propagação do centro reativo.

3. Terminação: As reações de polimerização são frequentemente interrompidas através da ligação direta (covalente) das duas extremidades da cadeia com radicais livres (reação de combinação) ou pela troca de um átomo de hidrogénio de uma cadeia em crescimento para outra (reação de desproporção).

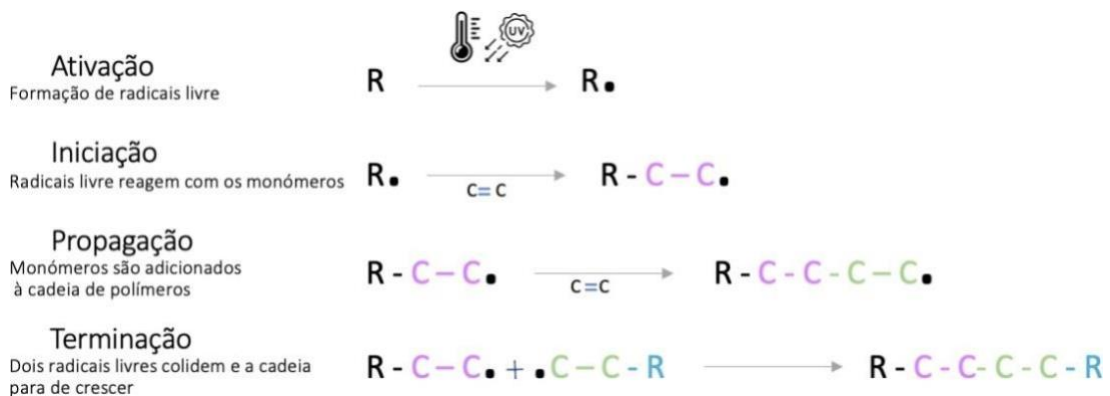


Figura 3. Etapas de polimerização sofridas por metacrilatos à base de resina usados em medicina dentária (Young & Novel, 1991). Adaptado de Delgado (2021).

Sabendo que o processo de polimerização dos monómeros presentes nas resinas é incompleto, uma vez que uma reação total num sistema complexo é irreal, foi reportado que a taxa de conversão dos monómeros funcionais varia entre 35% a 70% (Schmalz et al., 2018).

A taxa de conversão dos monómeros em polímero depende, desta forma, de fatores como a intensidade da luz emitida, o tempo de polimerização e a composição química da resina composta escolhida (Halvorson et al., 2003). Ora, uma elevada taxa de conversão de monómero em polímero, durante a reação de polimerização, é essencial para garantir propriedades físicas e mecânicas satisfatórias e compatibilidade com as estruturas biológicas (Strazzi-Sahyon et al., 2020). Assim, parte dos monómeros não polimerizados

permanecem como monómeros livres, podendo ser libertados, reagindo com as células do tecido pulpar dentário. Isto pode provocar alterações fisiológicas sobre a atividade das células pulpares (Kim et al., 2015).

2.2 Degradação

Uma das grandes desvantagens dos polímeros dentários é a sua longevidade, à luz dos fenómenos de degradação a que estão sujeitos no ambiente oral. A libertação de monómeros não reagidos por dissolução, a degradação das ligações cruzadas da matriz orgânica de resina e a hidrólise das interfaces da restauração influenciam negativamente as propriedades físico-químicas dos materiais, condicionado o seu tempo de vida (Takeshige et al., 2007). De forma similar, outras teorias que abordam a degradação de restaurações com recurso a resinas compostas incluem a formação de *microcracks*, através de ciclos sorção/dessorção que, conseqüentemente, potenciam a degradação hidrolítica do polímero (Yiu et al., 2004). Segundo Oshida et al. (1995), a água provoca stress residual entre as regiões húmidas e secas da restauração, quando em contacto com as restaurações dentárias, prejudicando as propriedades mecânicas. Tais fenómenos supramencionados criam um ciclo degradador dos polímeros dentários.

O desgaste e a degradação da interface dente-restauração provocam a libertação, a longo prazo, de produtos resultantes da biodegradação do material restaurador. Esta acontece também devido à ação enzimática, como quando em contacto com esterases da saliva humana (Geurtsen et al., 2000), capazes de degradar a ligação éster presente no grupo vinil dos monómeros de metacrilato. Conseqüentemente, estes monómeros e oligómeros libertados para o corpo, devido à degradação, têm também a possibilidade de exercer danos de citotoxicidade nas células pulpares e gengivais (Goldberg., 2007), como abordado anteriormente.

2.3 Procura por Bioatividade

Uma revisão sistemática realizada por Iftikhar (2021), concluiu que, nos últimos 8 anos, devido ao crescente desinteresse em materiais como a amálgama dentária, cimentos isentos de resina e coroas metálicas, tem ocorrido um exponencial aumento do entusiasmo em torno dos materiais dentários bioativos que cumpram requisitos estéticos mais

exigentes, mas que permitam igualmente manter a longevidade dos mesmos na cavidade oral. A procura da bioatividade surge assim para colmatar problemas de longevidade das resinas compostas, tentando solucionar problemas como o aparecimento de lesões de cárie secundária, por invasão bacteriana ou a potencial remineralização da interface resina-dentina (Cheng et al., 2017).

Assim, vários materiais restauradores têm vindo a ser desenvolvidos com funcionalidades bioativas, nas quais se incluem, a título de exemplo:

- 1) Desenvolvimento de propriedades antimicrobianas, com a inclusão de polímeros de metacrilato quaternário de amónia às resinas compostas (He et al., 2013);
- 2) Formação de hidroxiapatite, preenchendo *gaps* marginais produzidos que se formam devido à contração de polimerização, através da adição de vidro bioativo à formulação de resinas compostas;
- 3) Estimulação da remineralização, como por exemplo através da adição de fosfato de cálcio à formulação das resinas compostas (Langhorst et al., 2019).
- 5) Regeneração tecidual guiada, com recurso a fosfato de cálcio (Jeong et al., 2019).

Apesar das várias tentativas de fabrico de materiais restauradores bioativos, são ainda necessários vários testes *in vitro* e *in vivo*, de forma a permitir a segura comercialização dos mesmos, devido ao facto de grande parte das resinas atuais serem bioinertes (Zhang et al., 2017). Assim sendo, para que seja possível a introdução destes produtos no mercado, torna-se imprescindível o estudo da biocompatibilidade e citotoxicidade dos mesmos (Cheng et al., 2017).

2.4 Toxicidade

Como referido anteriormente, as resinas compostas apresentam na sua constituição vários monómeros diferentes, entre eles, monómeros com capacidade de reticulação. A libertação e capacidade de difusão destes monómeros e de outros, não reticuláveis, resultante de uma incompleta polimerização ou da degradação da matriz orgânica em contacto com a saliva, tem sido um problema bastante abordado em investigação (Bationo et al., 2021; Geurtsen et al., 1998). Alguns autores referem que a citotoxicidade dos adesivos dentários poderá estar relacionada com diversos fatores, tais como a concentração do adesivo, o tempo de exposição, pH, parâmetros de polimerização e ainda com a temperatura e inibição de polimerização devido à inibição de oxigénio (Dewaele et al, 2009; Eliades et al, 2000; Ferracane, 1994 & Franz et al, 2009).

Um estudo realizado por Salehi et al. (2015), concluiu que o efeito de monómeros residuais não reagidos parece ser a principal causa de citotoxicidade das resinas compostas dentárias. Ora, posto isto, torna-se claro que sistemas de monómeros que atinjam graus de conversão mais elevados apresentem menor citotoxicidade do que o contrário (Caughman et al., 1991).

A maioria dos estudos realizados que estabelecem um *ranking* de citotoxicidade aos monómeros básicos seguem a seguinte ordem: Bis-GMA >UDMA>TEGDMA>HEMA (Darmani et al., 2007; Issa et al., 2004; Moharamzadeh et al., 2017). No entanto, relativamente a misturas adesivas, a questão que aborda que grupos de adesivos dentários são mais propensos a induzir citotoxicidade é controversa, dependendo da combinação de monómeros em cada formulação e a libertação dos mesmos (Almarroof et al., 2017).

Simultaneamente, considerando que, nos diversos estudos, várias metodologias foram usadas com diferentes linhagens celulares e protocolos de extração ou exposição, a robustez das comparações torna-se reduzida (Jiang et al., 2017).

Num estudo realizado por Koulaouzidou et al. (2009), onde foi testada a biocompatibilidade de sistemas adesivos, os sistemas adesivos *etch-and-rinse* apresentaram maior citotoxicidade do que os adesivos *self-etch*, no entanto, Bianchi et al.

(2013) concluíram o contrário, defendendo que os sistemas adesivos *self-etch* seriam considerados como os mais citotóxicos.

Relativamente aos monómeros de reticulação, estudos referem que os monómeros de metacrilato livres têm capacidade de provocar reações locais como inflamação gengival e irritação (Cohn-Inostroza et al., 2015), promovendo também o crescimento bacteriano e posterior formação de lesões cariosas (Goldenberg., 2007).

Para além dos monómeros de reticulação convencionais, é importante estudar os monómeros funcionais acídicos e não acídicos, no que toca ao seu potencial citotóxico, uma vez que os seus perfis de toxicidade ainda são desconhecidos. Estes monómeros fazem parte de sistemas adesivos e formulações auto-adesivas. Estudos realizados por Kim et al. (2015), sugerem que, em concentrações associadas a baixa toxicidade, o monómero 10-MDP, popularmente utilizado em formulações adesivas, perturba significativamente a capacidade de diferenciação das células pulpares em odontoblastos, produzindo efeitos negativos na formação de dentina reparadora (Kim et al., 2015).

Krifka et al. (2012), estudou outros monómeros, como o HEMA, capaz de se ligar aos glutatiões celulares, reduzindo os níveis dos mesmos e causando, conseqüentemente, uma desregulação da expressão da enzima glutatião peroxidase. Esta desregulação tem como consequência um aumento do stress oxidativo celular, prejudicial à viabilidade das células. Reitera-se ainda que os monómeros presentes nas resinas, quando libertados, são capazes de induzir a apoptose das células dentárias pulpares através da produção de radicais reativos de oxigénio e depleção de glutatiões (Kim et al., 2015).

Assim, devem ser tomadas medidas de forma a reduzir a citotoxicidade provocada pelos materiais dentários, promovendo a pesquisa e utilização de formulações que não contenham na sua composição substâncias reativas e citotóxicas responsáveis por efeitos adversos (Bationo et al., 2021).

3. Ensaio de Citotoxicidade

De forma a testar a sua toxicidade e comprovar biocompatibilidade, antes de serem introduzidos no mercado, os novos ou modificados dispositivos e produtos médicos são sujeitos a testes que precedem os testes clínicos. Estes testes podem ser *in situ* ou *in vivo*, garantindo a segurança e efetividade dos produtos. Incluem, na sua generalidade, testes de citotoxicidade, irritação, sensibilidade e também testes de reatividade intra-cutânea (Mishra et al., 2016). Nos materiais dentários foi verificada a existência de citotoxicidade em diversos estudos realizados em materiais como resinas compostas (Salehi et al., 2015), adesivos dentários (Kim et al., 2015) ou materiais ortodônticos (Xu et al., 2021).

Atualmente, os testes *in vitro* de citotoxicidade são considerados ensaios de eleição na fase inicial de pesquisa laboratorial quando se procura a avaliação da biocompatibilidade de materiais dentários. Estes testes são realizados em modelos *in vitro* e utilizam sistemas que detetam alterações celulares como o crescimento, replicação e morfologia. Para além de imprescindíveis pela relevância dos seus resultados, estes testes são também parte dos requisitos atuais obrigatórios para a comercialização de materiais dentários (Mishra et al., 2016).

Para este fim., são utilizados vários testes *in vitro*, tais como o ensaio de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) que avalia a atividade metabólica (Alvarez et al., 2019). Este ensaio é amplamente descrito na literatura e recomendado por normas internacionais como a norma ISO 10993-5 (2009) (“*International Standard of Biological Evaluation of Medical Devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity*”).

3.1 Ensaio de MTT e Regulamentação ISO

O ensaio de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium] (MTT), vulgarmente conhecido pela sua sigla, é um ensaio laboratorial quantitativo, usado como parâmetro de citotoxicidade, que avalia a taxa metabólica e viabilidade celular após exposição das células a um agente potencialmente citotóxico, sendo amplamente utilizado como teste de rastreio (Berridge et al., 2005). O ensaio colorimétrico envolve a conversão de um precipitado amarelo de MTT num precipitado insolúvel de formazam, por ação da

enzima oxidoreductase, presente nas mitocôndrias das células viáveis (Cheng et al., 2012). O precipitado de formazam é posteriormente solubilizado, sendo medida a densidade ótica do mesmo (Kumar et al., 2018). A redução do MTT em formazam é efetuada pelas células viáveis, traduzindo-se num método quantitativo rápido e fácil para determinar a viabilidade celular. Este ensaio laboratorial foi o preferido e utilizado no presente trabalho.

O teste de MTT está descrito e regulado pela norma da *International Organization of Standardization* (ISO). Esta entende-se por ser a federação mundial de standardização de todo o tipo de procedimentos, o que inclui também a investigação para a avaliação de dispositivos e produtos médicos, envolvendo testes biológicos. Os testes de citotoxicidade in vitro dividem-se em três possíveis categorias em função do tipo de material a ser testado: teste de extratos, contacto direto e contacto indireto, sendo o ensaio de MTT padronizado na ISO 10993-5 (2009).

4. Enquadramento

A redução do tempo de trabalho e da sensibilidade à técnica tornam a utilização das resinas compostas auto-adesivas bastante aliciente na prática clínica (Poitevin et al., 2013; Delgado et al., 2021). No entanto, devido aos fracos resultados laboratoriais e clínicos associados à muito limitada interação com os substratos (Mine et al., 2017), e a uma adesão insuficiente (Brueckner et al., 2017), comprometendo a resistência das mesmas (Takamiya et al., 2021), as resinas auto-adesivas não são ainda utilizadas com regularidade na prática clínica. De forma sustentada, a evidência científica tem revelado que a eficácia da adesão nas formulações comercializadas de compósitos autoadesivos é, na generalidade, menos eficaz do que com recurso a sistemas adesivos *self-etch e etch and rinse* (Viotti et al., 2009), tornando pertinente e necessária a pesquisa por novas composições que tornem a utilização destes materiais mais previsível (Maas et al., 2017).

Por outro lado, a avaliação da biocompatibilidade é considerada mandatária para o desenvolvimento de qualquer material com aplicação médica, sendo crucial a simulação in vitro das condições clínicas para determinação do potencial citotóxico dos materiais (ISO, 10993-5:2009).

A evidência científica, nomeadamente autores como Salehi. (2015) e Goldenberg. (2008) ou Garcia et al. (2016), defendem que existe uma clara libertação de monómeros livres, não polimerizados, por parte dos materiais à base de resina. Kim et al. (2015), estudou isoladamente o monómero funcional 10-MDP, concluindo que o mesmo exerce efeitos negativos na diferenciação das células pulpares e odontoblastos. A par destes monómeros, Krifka et al. (2012) concluiu que o monómero funcional HEMA provoca a libertação de iões e depleção de glutatiões que parecem contribuir fortemente para a apoptose e necrose pulpar. Existe escassez de evidência acerca de outros monómeros funcionais, nomeadamente monómeros acídicos.

Ora, estando estes monómeros frequentemente presentes na composição das resinas compostas auto-adesivas, e considerando o número limitado de estudos comparativos entre os monómeros funcionais, torna-se pertinente e necessária a pesquisa por evidência científica que permita formular resinas auto-adesivas mais previsíveis e com uma utilização mais segura.

Esta investigação laboratorial parte, desta forma, da necessidade de testar a citotoxicidade de diferentes monómeros funcionais incorporados na formulação de resinas auto-adesivas, com o intuito de desenvolver novos materiais restauradores biocompatíveis.

*Efeito da variação de monómeros funcionais na formulação de novas resinas auto-adesivas:
estudo de citotoxicidade*

II. Objetivos do Estudo

Avaliar e comparar a citotoxicidade de diferentes resinas auto-adesivas experimentais, variando o monómero funcional, pelo método indireto de extrato, em ensaio de MTT às 24 horas, utilizando células do tipo pré-odontoblástico. Comparar de forma qualitativa, o crescimento celular sobre as diferentes resinas auto-adesivas, utilizando microscopia eletrônica de varrimento (MEV)

III. Hipóteses do Estudo

Hipótese Nula 0.1: A variação de monómero funcional, em resinas experimentais auto-adesivas, não resulta em diferenças na atividade metabólica, às 24 horas, por ensaio de MTT.

Hipótese Alternativa 1.1: A variação de monómero funcional, em resinas experimentais auto-adesivas, resulta em diferenças na viabilidade celular, às 24 horas, por ensaio de MTT.

*Efeito da variação de monómeros funcionais na formulação de novas resinas auto-adesivas:
estudo de citotoxicidade*

IV. Materiais e Métodos

1. Amostra de Estudo

O estudo laboratorial em questão foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), com o número de processo interno 1060, uma vez que contempla a utilização de linhas celulares.

Para a realização do estudo de citotoxicidade pelo método indireto, utilizando extratos, foram utilizados como amostra de estudo 8 discos de resinas auto-adesivas, confeccionados a partir de 5 grupos experimentais, com diferentes monómeros funcionais como a seguir descrito em 1.1. O presente trabalho laboratorial foi realizado no Laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz e no Instituto de Investigação Clínica e Biomédica da Universidade de Coimbra (iCBR).

1.1 Formulação das Resinas Compostas Auto-adesivas

Para este estudo foram formuladas 5 resinas compostas auto-adesivas experimentais, variando o monómero funcional em cada uma das composições químicas (Figura 4). As resinas foram preparadas utilizando uma mistura de pó (partículas de carga) e uma mistura líquida (monómeros e sistema de fotoiniciação). A mistura de pó continha na sua constituição partículas de carga vítreas de diferentes tamanhos: vidros de bário a 1,5 μm e 0.4 μm e nanopartículas de sílica ($> 100 \text{ nm}$). Perfez-se uma mistura de 21,6 g de pó, no total, juntando 60 wt%, 30 wt% e 10 wt%, respetivamente, de cada um dos tamanhos de partículas mencionados acima. As partículas foram subsequentemente misturadas num pote opaco a 1000 rpm, durante 30 s, numa misturadora com força centrífuga (DAC 515-200 SE, *Flackteck SpeedMixer, Louisville, CO, USA*) de modo a homogeneizar o pó. Paralelamente, a mistura líquida de resina (18 mL) foi constituída por uma junção heterogénea de monómeros de metacrilato e, como fotoiniciador, canforoquinona, adicionada a 1 wt%. O monómero base foi o UDMA que variou entre 60 wt% a 70 wt% dependendo do grupo experimental, com posterior adição de 24 wt% de TEGDMA como diluente. Em 4 dos 5 grupos experimentais foram adicionados diferentes monómeros

funcionais (Figura 4) – o 10-MDP, GPDM, HEAA e HEMA a 10 wt%, sendo que o grupo de controlo teve 10 wt% adicionais de UDMA, perfazendo os 70%. Assim, originaram-se as seguintes formulações e respetivos códigos:

- 1) UT_CTRL → 70 wt% UDMA + 24 wt% TEGDMA (grupo de controlo)
- 2) UT_MDP → 60 wt% UDMA + 24 wt% TEGDMA + **10 wt% 10-MDP**
- 3) UT_GPDM → 60 wt% UDMA + 24 wt% TEGDMA + **10 wt% GPDM**
- 4) UT_HEAA → 60 wt% UDMA + 24 wt% TEGDMA + **10 wt% HEAA**
- 5) UT_HEMA → 60 wt% UDMA + 24 wt% TEGDMA + **10 wt% HEMA**

As misturas líquidas foram levadas a uma placa de mistura magnética, a 150 rpm durante 24 horas. Por fim, realizou-se a mistura do pó ao líquido, utilizando uma proporção de 2:1, respetivamente, misturando ambos durante 45 s a 1500 rpm (DAC 515-200 SE, *Flackteck SpeedMixer, Louisville, CO, USA*). As partículas de carga e o seu rácio mantiveram-se iguais em todas as formulações, sendo a única variável o monómero funcional. As resinas foram armazenadas em potes opacos, a 4 °C até ao seu uso.

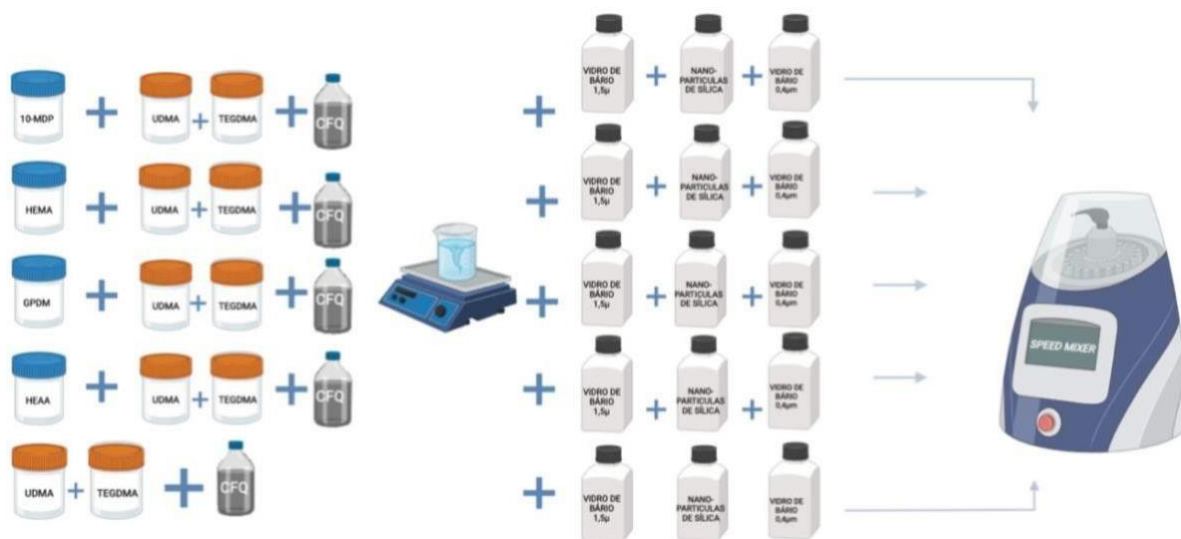


Figura 4. Esquema representativo da confecção de resinas compostas auto-adesivas.

1.2 Confeção dos discos de resina auto-adesiva

Para os ensaios de citotoxicidade realizados, foram confeccionados 8 discos polimerizados, por grupo experimental pelo seguinte método ilustrado na Figura 5.



Figura 5. Confeção de discos de resina.

Cada resina previamente formulada foi introduzida em anéis de silicone do tipo *O-Ring* de dimensões padronizadas (10 x 1 mm), com o auxílio de uma espátula. De seguida, procedeu-se à polimerização dos discos de resina seguindo o padrão cíclico sobreposto descrito na ISO 10993-5 (2009), de forma a padronizar e abranger o tamanho de cada disco (Figura 6). Para a polimerização foi utilizado um fotopolimerizador LED de alta intensidade COXO modelo DB686 (*Froshan COXO Medical Instruments, Guangdong, China*), com um comprimento de onda entre os 420 e os 480 nm e uma potência de irradiação na ponta, de 700 mW/cm², medida a cada três utilizações com recurso ao radiómetro analógico *Optilux Radiometer (SDS Kerr, Orange, EUA)*. Foram utilizadas como referência folhas de papel de acetado em contacto com o fotopolimerizador e foram realizadas 4 fotopolimerizações de 20 s (em cada canto do disco) nas duas faces do disco para garantir a padronização.

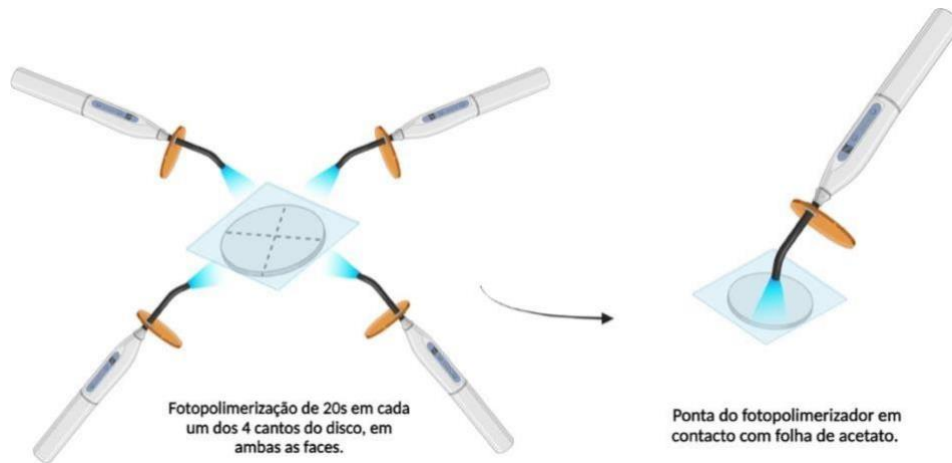


Figura 6. Esquema ilustrativo do protocolo de polimerização de discos de resina auto-adesiva, em concordância com a ISO 4049 (2019).

1.3 Preparação dos Discos e Obtenção dos Extratos

Os 8 discos de resina de cada grupo experimental, previamente confeccionados, foram esterilizados com recurso a um aparelho de esterilização UV (Ultragen, Viseu, Portugal) (Figura 7) durante 20 minutos de cada lado, sendo posteriormente introduzidos em tubos *Falcon* de 50 mL (*Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha*).



Figura 7. Aparelho de Esterilização UV- Ultragen, Viseu, Portugal

De seguida, foram adicionados 5,3 mL de meio Dulbecco Modificado (DMEM) a cada *Falcon* e os mesmos foram mantidos durante 24 horas em agitação constante (Figura 8) na estufa *HeraCell® 150* (*Thermo Electron Corporation, Palm Beach, FL, EUA*), com 95% de humidade relativa, 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.



Figura 8. Meios condicionados com discos de resina auto-adesiva

Após a incubação, foram realizadas as diluições dos extratos nas concentrações pretendidas (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%) através de adições sucessivas de 1 mL de meio celular a 1 mL de extrato (Figura 9).

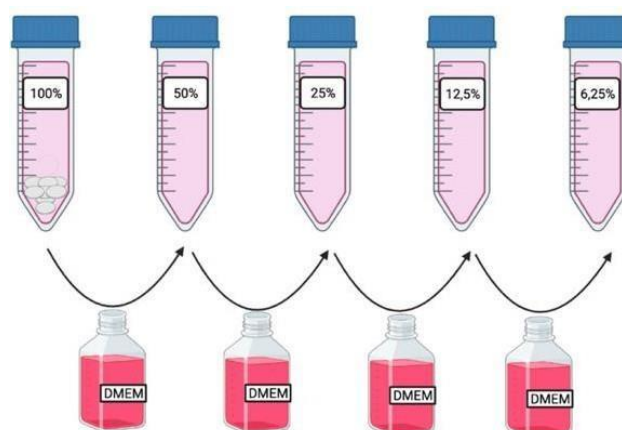


Figura 9. Esquema representativo da diluição dos extratos.

24 horas após a incubação dos extratos, procedeu-se à medição do pH do meio DMEM não condicionado e dos meios condicionados com os extratos dos vários grupos estudados com recurso a um medidor de pH (ISE 710A, Orion Research Inc., Boston, MA, USA), previamente calibrado com soluções de pH conhecidos. Foram realizadas 3 medições de cada concentração de cada grupo experimental e do meio DMEM.

2. Cultura Celular

Foi utilizada uma cultura celular de células do tipo odontoblastos da linhagem MDPC-23 (Figura 10), cedidas pelo Professor *Jacques Nör* (*University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA*), apresentando uma confluência entre 80-90%.

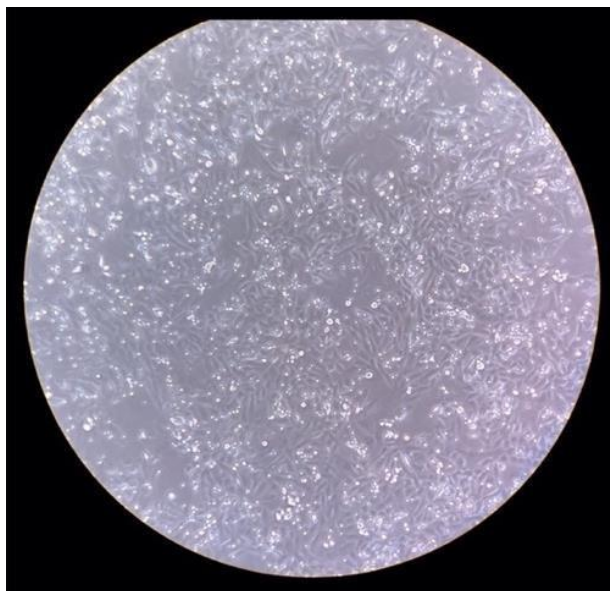


Figura 10. Imagem microscópica de células MDPC-23 em suspensão.

As células foram cultivadas em meio de DMEM suplementado com soro fetal de bovino (FBS) (*Gibco 11360, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) e incubadas a 37 °C num ambiente com pressão atmosférica de CO₂ a 5%, de acordo com as recomendações da norma ISO-10993 (2009). Para preparar as soluções, as células foram destacadas através da lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) (NaCl, Sigma S7653, *Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA*) e Tripsina-EDTA (12605028, *Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, USA*).

Foi realizada a contagem das células com recurso a Azul-tripano 0.4% (T8154, *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) e procedeu-se ao cálculo da concentração celular das células em suspensão. Posteriormente, soluções com uma concentração de 50.000 cel/mL foram incubadas em placas de 48 poços (*Sarstedt 83.3923, Nümbrecht, Germany*) durante 24 horas, para permitir a adesão celular (Figura 11), de acordo com as recomendações de Paula et al. (2021).

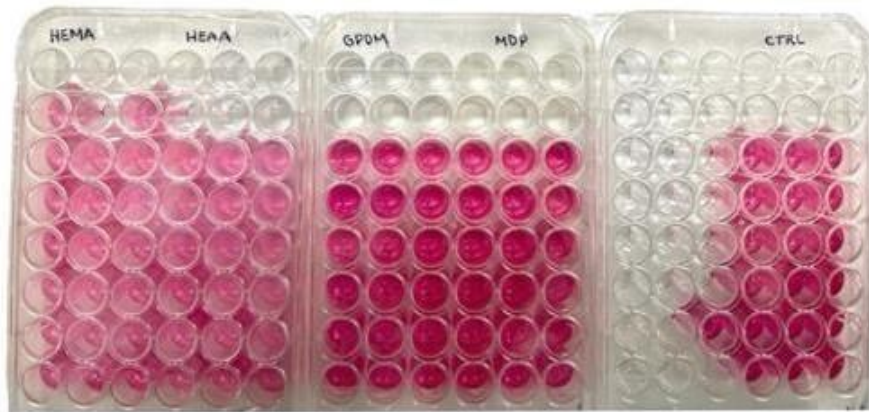


Figura 11. Placas de cultura celular.

3. Materiais

Os materiais usados na presente investigação estão descritos e detalhados na Tabela 1, abaixo representada.

Tabela 1. Materiais utilizados – composição e especificações técnicas.

Material	Composição	Lote
1,5 µm BaG	Vidro de bário	2103000683
0,4 µm BaG	Vidro de bário	2103000683
Aerosil-50	Nanopartículas de sílica	200100095
CFQ	Canforoquinona	2102000343
MDP DM Healthcare, Dubai, UAE.	10- Metacrilóiloxidecil dihidrogenofosfato	P01354
GPDM DM Healthcare, Dubai, UAE	Ácido glicerofosfórico dimetracrilato	P01231
HEMA Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan.	2-Hidroxietil metacrilato	SEPDB-KC
UDMA Sigmaaldrich, Schnelldorf, Germany.	Uretano dimetacrilato	72869864
TEGDMA Polysciences, Warrington, PA	Trietilen- glicol dimetacrilato	01319250
HEAA Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan	2- Hidroxietil acrilamida	I8DSD-QO
DMEM Sigma, Kawasaki, Japan	5,55 mM D-glucose (Dextrose); 1 mM piruvato de sódio; aminoácidos; vitaminas	-
PBS Sigma, St. Louis, MO, USA	137 mM de cloreto de sódio; 2,7 mM de cloreto de potássio; 10 mM de hidrogenofosfato de sódio; 1,8 mM de hidrogenofosfato de potássio	-
Tripsina-EDTA GibcoTM, Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, USA	5,5 mM de D-Glucose (Dextrose); 0,30 mM de EDTA; 0,003 mM de Vermelho de Fenol; 0,01 mM de Tripsina	-
MTT Sigma M2128, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	[3-(4,5-dimetiltiazol-2) - 2,5-difenil tetrazolium]	-
Isopropanol Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	70% Álcool isopropílico em H ₂ O	-
FBS Gibco 11360, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Hemoglobina fetal de bovino, ≤25 mg/dl	-

4. Incubação Celular e Ensaio de MTT

4.1 Incubação Celular com os Extratos de Resina

A incubação das células durante 24 horas, o meio de cultura foi aspirado das placas de cultura e procedeu-se à administração dos extratos solúveis previamente preparados em cada poço nas diferentes concentrações anteriormente descritas (Figura 12). De seguida, as placas foram novamente incubadas durante 24 horas.



Figura 12. Administração dos extratos em diferentes concentrações nas células MDPC-23.

5. Avaliação da atividade metabólica

24 horas após a incubação celular com os extratos de resina, procedeu-se à aspiração do meio de cultura das placas e lavagem de cada poço com PBS. De seguida, foi introduzido em cada poço o volume de 0.5 mg/ mL de MTT (Sigma M2128, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) preparado em PBS (Figura 13). As placas foram novamente incubadas em escuridão durante a noite a 37 °C.



Figura 13. Placas de cultura com células MDPC-23 após adição de MTT.

No dia seguinte, os cristais de formazam obtidos foram solubilizados com a adição de uma solução de 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) a cada poço e procedeu-se à agitação das placas durante 30 minutos.

Finalmente, a absorvância foi quantificada num comprimento de onda de 570 nm com um filtro com valor de referência de 620 nm, com recurso a um espectrofotómetro *EnSpire® (PerkinElmer Inc., Shelton, CT, USA)* (Figura 14).

A atividade metabólica foi expressa em percentagem e calculada a partir da relação entre a atividade metabólica das culturas submetidas aos meios condicionados e as culturas de células de controlo.

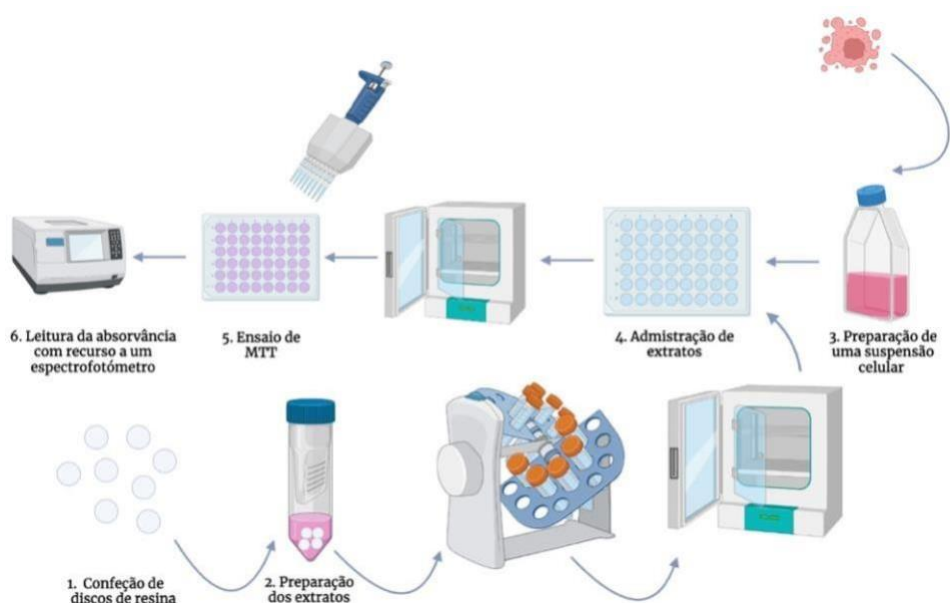


Figura 14. Esquema representativo do ensaio de MTT.

6. Observação de imagens com recurso a microscopia eletrónica de varrimento Dois

discos de cada grupo experimental, anteriormente confeccionados, foram esterilizados com recurso a radiação UV, como descrito anteriormente e introduzidos num banho de ultrassons (*Euronda ultrasonic 22., Veneza, Itália*).

Uma suspensão de 50 mL de células MDPC-23 utilizadas no estudo foi fixada a um disco de resina de cada grupo experimental com uma solução tampão de 3% de glutaraldeído e 0.1 M de cacodilato, tendo sido posteriormente mantidos a 37° C, 95% ar, 5% de CO₂ e 95% de humidade durante 1h em placas de cultura. Adicionou-se, de seguida, 1 mL de DMEM a cada disco e foram novamente introduzidos na estufa durante 24 h (Figura 15).

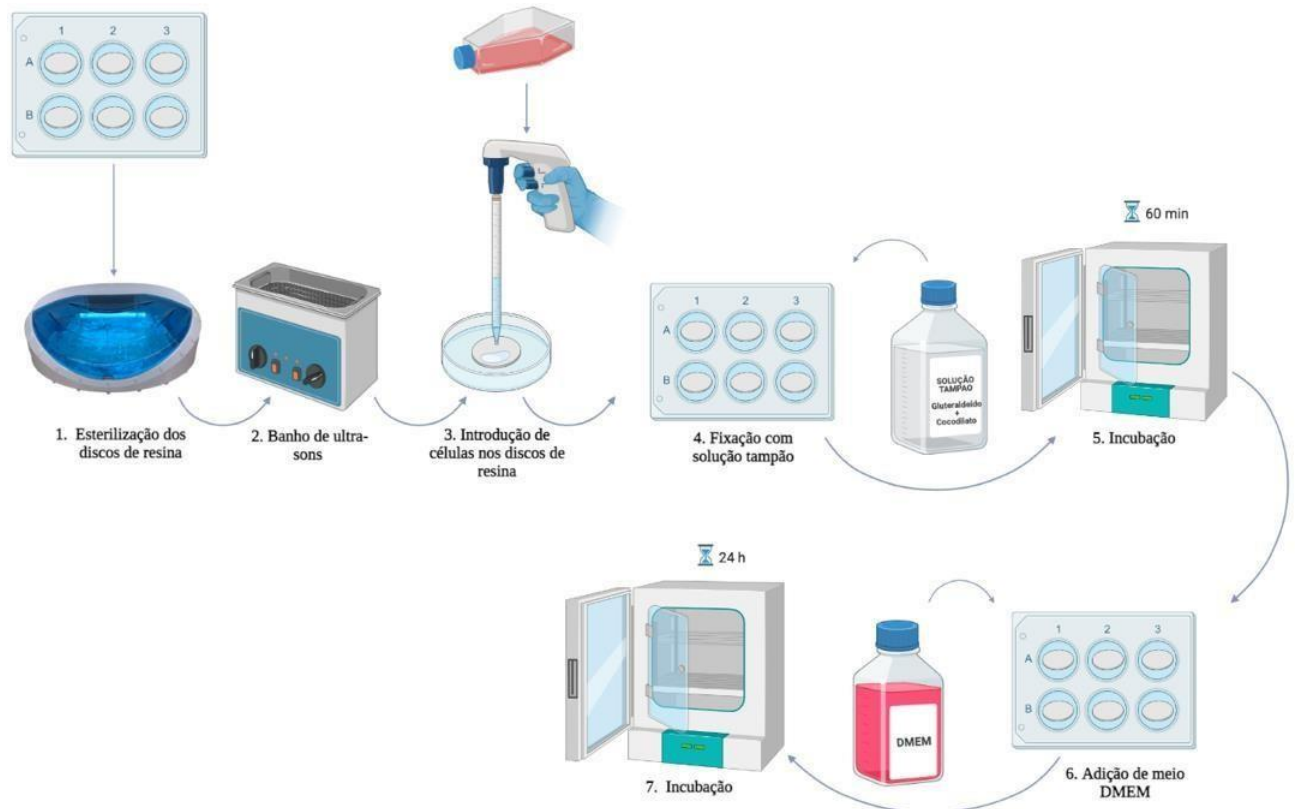


Figura 15. Esquema ilustrativo do protocolo de fixação das células nos discos de resina.

No dia seguinte, foram realizadas sucessivas desidratações em diferentes concentrações alcoólicas (50%, 70%, 90% e 100%), mantendo os discos durante 10 minutos em cada concentração (Figura 16). Os discos foram posteriormente secos numa solução de hexametildisilazano (HMDS) durante 1 h.

Efeito da variação de monômeros funcionais na formulação de novas resinas auto-adesivas: estudo de citotoxicidade

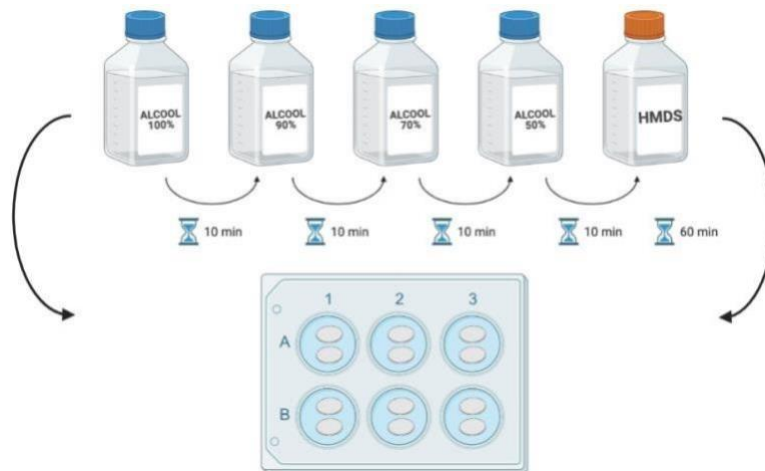


Figura 16. Esquema ilustrativo do protocolo de desidratação das amostras.

Para observação microscópica, os discos foram cobertos com ouro (95%) e paládio (5%) (Figura 17) com recurso a uma máquina de evaporação a vácuo, JEOL JEE-400 (Peabody, MA, USA) (Figura 18).



Figura 17. Discos de resina cobertos com ouro e paládio.



Figura 18. Máquina de evaporação a vácuo JEE-400.

Os discos foram colocados num suporte metálico redondo com fita autocolante condutora de carbono. Foi utilizada microscopia eletrónica de varrimento (MEV) com microscópio JEOL JSM 5400 (*Peabody, MA, USA*) (Figura 19), a fim de visualizar a superfície dos discos.

As amostras foram observadas nas ampliações de 500x, 750x e 1500x com uma distância de trabalho de 11 mm e alta voltagem de 20 kV.



Figura 19. Microscópio eletrónico de varrimento- JEOL JSM 5400.

7. Análise estatística

As células submetidas aos extratos foram comparadas com culturas controle (normalizadas a 100%) e foram realizados 3 ensaios independentes.

A análise estatística foi realizada com recurso ao software *Origin Pro 2021* (Northampton, MA, USA). Os resultados da atividade metabólica celular foram comparados usando uma análise de variância *ANOVA two way* com *post-hoc* de *Bonferroni*, após confirmação dos critérios de normalidade, utilizando um teste de *t-student* e homogeneidade, com recurso a um teste de *Shapiro-wilk*, das variáveis quantitativas. Foi considerado um valor de significância de 5%.

V. Resultados

1. Ensaio de MTT

Os resultados obtidos a partir do ensaio de MTT, com gráficos de comparação pareados, encontram-se ilustrados no Gráfico 1. O teste *ANOVA two-way* revelou diferenças significativas entre os grupos estudados apenas em concentrações abaixo de 100% (50, 25, 12,5 e 6,25%) e entre os grupos experimentais contendo HEMA e HEAA como monómeros funcionais.

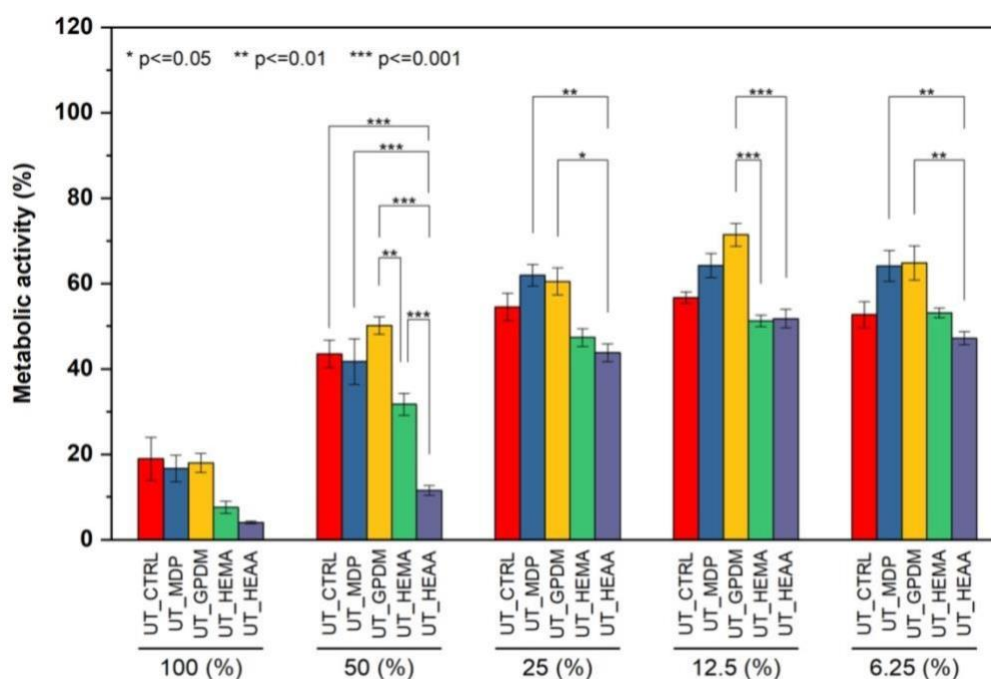


Gráfico 1. Atividade metabólica, em percentagem, resultante dos resultados do ensaio de MTT, dividido pela concentração dos extratos, permitindo uma rápida comparação entre grupos. Foram observadas diferenças em concentrações $\leq 50\%$ (Bonferroni post-hoc). As barras de erro constituem erro padrão da média.

Para todas as concentrações estudadas, o uso de monómeros funcionais com grupo fosfato (MDP e GPDM) demonstrou resultados semelhantes ao grupo de controlo (Bonferroni, $p \leq 0,05$). Na concentração de 50% foram verificadas variações significativas entre o grupo que continha o monómero HEAA e os restantes grupos estudados (Bonferroni, $p \leq 0,001$) e entre o grupo que continha o monómero GPDM e o grupo experimental que incluía o monómero HEMA (Bonferroni, $p \leq 0,01$).

Na concentração de 25% foram encontradas alterações entre os grupos que continham os monómeros MDP e GPDM e o grupo que incluía o extrato de resina auto-adesiva com o monómero HEAA incorporado (Bonferroni, $p \leq 0,01$), sendo que não foram detetadas alterações significativas entre o mesmo e o grupo de controlo (Bonferroni, $p \leq 0,05$). Na concentração de 12,5% verificaram-se variações significativas entre o grupo que incorpora o monómero GPDM e os grupos contendo HEAA e HEMA, (Bonferroni, $p < 0,001$). Finalmente, na concentração de 6,25% apenas foram verificadas alterações significativas entre os grupos contendo GPDM e MDP e o grupo correspondente ao extrato de resina que inclui o monómero funcional HEAA (Bonferroni, $p < 0,01$).

À exceção da concentração de 50%, não foram verificadas alterações significativas entre os grupos que continham HEAA e HEMA em nenhuma outra concentração (Bonferroni, $p \leq 0,05$).

A atividade metabólica diminui significativamente após a exposição a altas concentrações (*ANOVA two-way model, Factor: concentration; F=240.4, $p < 0.001$*). A concentrações iguais ou inferiores a 12.5%, quase todas as resinas compostas auto-adesivas apresentaram valores iguais ou superiores a 50%. A tendência pode ser observada no Gráfico 2.

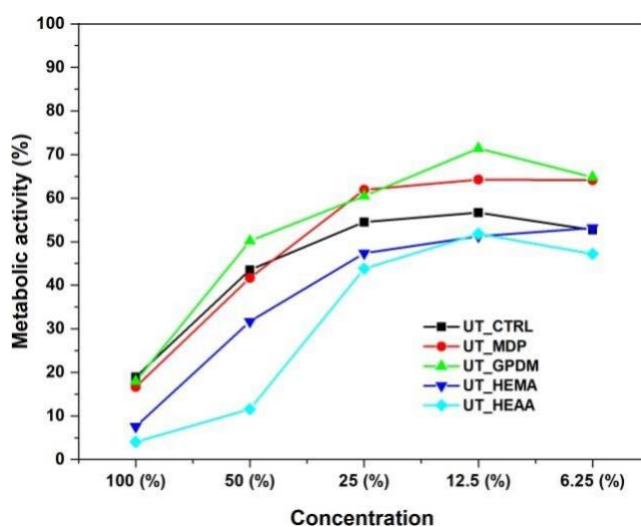


Gráfico 2. A linha de tendência para cada concentração, que demonstra valores de atividade metabólica mais elevados em concentrações mais diluídas de extratos de discos de resina.

A linha de tendência demonstra que, para todos os monómeros estudados, a percentagem de atividade metabólica amentou com a diminuição da concentração dos extratos.

Relativamente ao grupo de controlo, a maior variação de atividade metabólica ocorreu entre as concentrações de 100% e 50% dos extratos. O mesmo foi verificado nos grupos referentes aos extratos que continham os monómeros GPDM e HEMA, sendo que no grupo que continha o monómero 10-MDP a variação foi semelhante entre as concentrações de 100% e 50% e entre as concentrações de 50% e 25%.

Ao contrário dos restantes grupos, a maior variação de atividade metabólica no grupo que avaliou os extratos contendo o monómero HEAA ocorreu entre as concentrações de 50% e 25%.

2. Valores de pH

Procedeu-se à medição do pH do meio DMEM não condicionado e dos meios condicionados com os extratos dos vários grupos estudados com recurso a um medidor de pH (ISE 710A, *Orion Research Inc., Boston, MA, USA*), previamente calibrado com soluções de pH conhecidos. Foram realizadas 3 medições de cada concentração de cada grupo experimental e do meio DMEM.

Tabela 2. Valores de pH do meio DMEM não condicionado e em cada grupo de extratos de resina auto-adesiva em cada uma das concentrações estudadas.

Formulação Concentração	UT_CTRL	UT_MDP	UT_GPDM	UT_HEMA	UT_HEAA	Meio
100	8,3	8,1	8,3	8,3	8,4	8.0
50	8,3	8,0	8,1	8,1	8,3	
25	8,2	8,0	8,1	8,1	8,2	
12.5	8,1	7,9	8,1	8,0	8,0	
6.25	8	7,9	8,1	8,0	8,0	

O pH dos extratos dos meios condicionados encontrava-se entre o espectro neutro a alcalino. O valor máximo medido foi de 8,42 correspondente ao extrato contendo HEAA na concentração de 100%, enquanto o valor mínimo foi de 7,89 correspondendo ao extrato contendo o monómero 10-MDP na concentração de 6,25%.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as medições, indicando não existir variação considerável de pH influenciada pelos extratos.

3. Microscopia eletrônica de varrimento (MEV)

As imagens obtidas através da observação microscópica de varrimento estão representadas abaixo, na Figura 20. A imagem representada com a letra A corresponde à observação das imagens do disco de resina que contém 10-MDP na sua composição, a imagem B aos discos que contém o monómero HEMA, a imagem C corresponde ao monómero GPDM, a imagem D ao monómero HEAA e a imagem E ao grupo de controlo.

As setas correspondem às células e agregados celulares observados nas imagens de microscopia eletrônica de varrimento.

Na imagem A é possível observar um aglomerado celular de forma ovalada, indicando existir maior densidade celular no disco correspondente à resina composta auto-adesiva contendo o monómero 10-MDP.

Na imagem B é possível observar 2 a 3 células de forma ovalada, indicando uma reduzida densidade celular nos discos contendo o monómero HEMA.

Na imagem C é possível observar alguma densidade celular, semelhante ao que foi observado nos discos contendo o monómero 10-MDP.

Na imagem D foi apenas possível observar uma célula de forma ovalada, indicando existir baixa densidade celular no disco de resina auto-adesiva contendo o monómero HEAA.

Por fim, a partir da observação da imagem E, correspondente ao grupo de controlo,

observou-se uma densidade celular considerável de células ovaladas, superior ao que foi observado nas imagens dos discos contendo os monómeros HEMA e HEAA.

*Efeito da variação de monómeros funcionais na formulação de novas resinas auto-adesivas:
estudo de citotoxicidade*

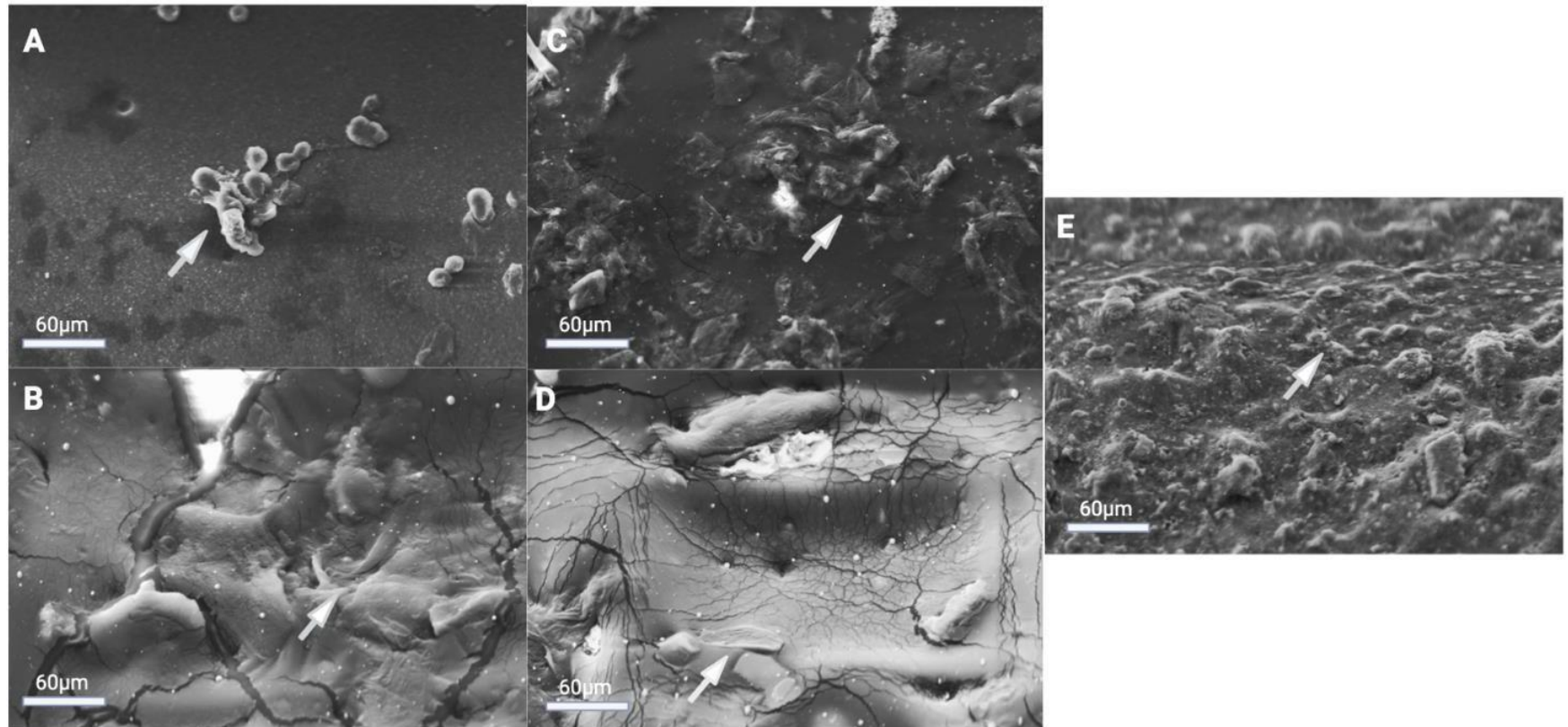


Figure 20. Imagens obtidas através da observação com recurso a um microscópio eletrónico de varrimento. As setas correspondem às células e agregados celulares.

VI. Discussão

Existe atualmente um elevado interesse no desenvolvimento de novos materiais restauradores autoadesivos que permitam aliar propriedades restauradoras e adesivas num único material, com redução do tempo de trabalho e da sensibilidade à técnica e tornando a prática clínica mais eficiente e previsível (Fu et al., 2013). No entanto, estudos revelaram limitações que estão associadas a uma adesão insuficiente (Çelik et al., 2015; Poitevin et al., 2013; Vichi et al., 2013), sendo relevante o desenvolvimento de investigações científicas que testem novas formulações, procurando solucionar as limitações encontradas.

Simultaneamente, a evidência científica comprovou já, a partir de variados estudos que, devido a uma incorreta polimerização, são frequentemente libertados componentes das resinas compostas utilizadas na prática clínica, produzindo efeitos potencialmente citotóxicos (Bationo et al., 2021; Gupta et al., 2012; Salehi et al., 2015).

A par das referidas limitações das resinas auto-adesivas desenvolvidas até ao momento, a sua formulação incorpora monómeros funcionais acídicos. Ora, a acidez dos materiais residuais poderá interferir com a reação ácido-base, não permitindo uma total neutralização do pH durante a reação de polimerização das resinas compostas, desencadeando a degradação e difusão de componentes citotóxicos para as células, tal como verificado em estudos prévios *in vitro* (Hiraishi et al., 2013). Por conseguinte, a difusão de componentes pode causar efeitos lesivos nos tecidos dentários, em especial em circunstâncias em que os procedimentos restauradores são particularmente desafiantes, em restaurações com pouco remanescente dentário e/ou em elevada profundidade (Luczaj-Cepowicz et al., 2017).

Embora frequentemente utilizados nas formulações de sistemas adesivos dentários, os efeitos citotóxicos de diferentes concentrações e combinações de monómeros funcionais acídicos são ainda amplamente desconhecidos (Kim et al., 2015), tornando este estudo de investigação bastante pertinente e cientificamente relevante.

O presente estudo de citotoxicidade foi desenvolvido segundo a norma ISO 10993-5 (2009) para padronização da técnica. Foi realizado um ensaio de MTT através do

método indireto, o que permite simular uma restauração realizada sobre a superfície da dentina, não existindo contacto direto com o complexo pulpar (Garcia et al., 2016) No entanto, de acordo com a literatura, a citotoxicidade levada a cabo superficialmente, afeta, eventualmente, os tecidos pulpares. Quando tal ocorre, a camada odontoblástica é a primeira a ser afetada. Assim, a utilização da linha celular odontoblástica MDPC-23 para o presente estudo de citotoxicidade torna-se pertinente, sendo considerada como um excelente modelo para estudos de biocompatibilidade de materiais dentários (Costa et al., 1999). De acordo com a ISO10993-5 (2009), a diminuição da atividade metabólica resulta, frequentemente, na diminuição do número de células vivas. Assim, o ensaio de MTT é considerado um bom teste preliminar para estudar a citotoxicidade de resinas dentárias.

Considerando que a libertação de monómeros residuais ocorre gradualmente e maioritariamente durante o período das primeiras 24 horas que sucedem a reação de polimerização dos materiais restauradores (Manojlovic et al., 2011; Paula et al., 2019), o ensaio de MTT foi realizado 24h após a exposição celular aos extratos nas referidas concentrações. Paralelamente, o efeito citotóxico das resinas compostas sobre as células tem sido fortemente atribuído à libertação de monómeros residuais (Goldenberg et al., 2008), como resultado de uma reação de polimerização incompleta, sendo esta quase sempre inevitável, ou aos subprodutos do processo de degradação da matriz de resina (Singh et al., 2009). Por conseguinte, resinas compostas que polimerizam melhor, atingindo uma maior taxa de conversão monómero-polímero, são geralmente tidas como sendo menos citotóxicas do que aquelas que não apresentam taxas de conversão aceitáveis, pelo monómero residual retido (Caughman et al., 1991; Högg et al., 2016).

No que toca aos resultados obtidos, a variação do monómero funcional alterou a atividade metabólica para valores obtidos em concentrações abaixo de 100% (50, 25, 12,5 e 6,25%) e entre os grupos experimentais contendo HEMA e HEAA como monómeros funcionais e os restantes grupos. Desta forma, a hipótese nula foi rejeitada.

Em todas as concentrações estudadas, HEMA e HEAA revelaram ser os monómeros mais citotóxicos. Os baixos níveis de atividade metabólica observados no extrato contendo HEMA são consistentes com o estudo de Ferracane et al. (2006), que observou

que durante o processo de infiltração da resina em dentina desmineralizada profunda ocorre uma grande quantidade de HEMA livre não reagido lixiviado do agente adesivo, levando a efeitos citotóxicos.

Os valores observados podem também ser justificados pela relação demonstrada entre a estrutura química dos monómeros e seu grau de citotoxicidade (Sideridou & Achilias, 2005). Sabe-se que a taxa de difusão da molécula é proporcional à raiz quadrada do peso molecular, contribuindo assim para que monómeros de baixo peso molecular sejam mais difusíveis para o meio, tornando-se mais citotóxicos (Bouillaguet et al., 1998). Assim, o peso molecular dos monómeros HEMA e HEAA, 130,1 g/mol e 115,1 g/mol respectivamente, é menor do que o peso dos restantes monómeros estudados no presente estudo. Desta forma, é possível que a difusão destes monómeros tenha ocorrido em maior quantidade, contribuindo para valores de atividade metabólica mais reduzidos.

Por outro lado, monómeros como HEMA e HEAA são de pequenas dimensões, sendo bastante reativos, e possuem um grupo hidroxilo (-OH) na extremidade, conferindo-lhes um comportamento hidrofílico quando em contato com a água. Este comportamento químico pode levar à degradação hidrolítica e lixiviação de monómeros (Reichl et al., 2008), possivelmente contribuindo para os reduzidos valores de atividade metabólica observados. Desta forma, fatores como a alta difusão dos monómeros reativos HEMA e HEAA e o perfil de polimerização dos materiais testados podem estar na base para as diferenças a concentrações inferiores a 100%, verificadas neste estudo.

Outra possível explicação para os resultados obtidos é o facto de diferentes monómeros causarem citotoxicidade através de diferentes mecanismos principais, demonstrando valores de toxicidade em diferentes níveis de concentração (Becher et al., 2006). Ora, para todas as concentrações estudadas, o uso de monómeros funcionais com grupo fosfato na sua composição (10-MDP e GPDM) demonstrou resultados semelhantes, sugerindo assim que os monómeros GPDM e 10-MDP conduzem a uma diminuição da atividade metabólica por meio de mecanismos semelhantes, não resultando em grandes variações entre eles.

A partir dos resultados obtidos, foi também verificado que, para todas as concentrações, não foram encontradas variações significativas entre os grupos contendo

10-MDP e GPDM e o grupo de controlo, sugerindo que a presença dos mesmos na formulação das resinas auto-adesivas a partir das quais os extratos foram obtidos, não terá contribuído para aumento do perfil de citotoxicidade.

Tais resultados poderão ser justificados graças às características químicas do monómero 10-MPD, que possui uma estrutura bifuncional: um grupo fosfato e um grupo metacrilato copolimerizável, separados por uma grande cadeia. Esta estrutura confere hidrofobicidade ao referido monómero, permitindo reações mais eficientes com o colágeno, estabelecendo conexões mais estáveis quando comparado a outros monómeros (Hiraishi et al., 2013).

Embora o monómero GPDM seja considerado hidrofílico, não possuindo uma cadeia grande como o 10-MDP, a sua estrutura química inclui dois grupos metacrilato de copolimerização, sendo capaz de formar uma matriz de resina mais forte quando comparado a monómeros com grupos monometacrilato, como o HEMA e HEAA (Yoshihara et al., 2018), potencialmente justificando os valores registados neste estudo.

A par das observações mencionadas, os resultados obtidos a partir do presente estudo revelam também que existe uma correlação entre a citotoxicidade e a concentração dos extratos que contém os monómeros avaliados. Os resultados observados estão de acordo com Ferreira et al. (2022), que testou adesivos dentários e observou que os valores de citotoxicidade eram dependentes da concentração do extrato e do tempo de incubação.

Da mesma forma, Kim et al. (2015) estudou o monómero 10-MDP e concluiu que o mesmo provocava inibição da proliferação celular numa relação dependente da concentração.

Neste estudo, o pH não indicou influenciar o comportamento citotóxico, uma vez que os resultados não demonstraram variações significativas ao comparar o pH do meio antes e após a adição dos extratos. No entanto, os resultados não suportam as pesquisas anteriores de Şişmanoğlu et al. (2020), que estudou diferentes cimentos de resina através de um ensaio de MTT em células 3T3 de fibroblasto e concluiu que a acidez provocada pelos monómeros presentes na formulação do cimento (UDMA, HEMA e monómeros de

ácido carboxílico) poderão ter sido responsáveis pela difusão de componentes tóxicos das resinas compostas.

A par deste estudo, Teshima (2010) concluiu que a hidrólise de monómeros de 10-MDP devido a fenômenos de degradação, produz ácido metacrílico (MA) e 10-hidroxidecil dihidrogenofosfato (HDP). Ao formar ácido fosfórico, o HDP poderá ser responsável pela diminuição do pH.

A acidificação do meio pode afetar a vitalidade do complexo pulpo-dentinário, promovendo os processos de desmineralização dos substratos dentários (Hirose et al., 2016). Do mesmo modo, Park et al. (1999) estudou também a influência da variação do pH em células HL-60, concluindo que a redução do pH seria responsável pelo aumento da atividade das caspases e consequente apoptose celular.

No entanto, os resultados obtidos no estudo podem possivelmente ser explicados pelo facto de o meio conter uma solução tampão: solução salina tamponada com fosfato (PBS), não permitindo grandes variações do pH durante as primeiras 24 horas. Assim, é possível sugerir que a citotoxicidade não parece ter sido causada pela variação do pH.

Em concordância com os resultados verificados a partir do ensaio de MTT, as imagens obtidas através da observação microscópica de varrimento demonstram uma densidade celular aumentada nas amostras de resina auto-adesiva contendo 10-MDP e GPDM, sendo mais reduzida nas amostras contendo os monómeros HEMA e HEAA.

Considerando que os monómeros funcionais são frequentemente utilizados nas formulações de adesivos e resinas dentárias, e tendo em conta a escassez de estudos comparativos disponíveis entre monómeros funcionais, os presentes resultados poderão fornecer pertinentes dados a ter em conta nas futuras formulações de materiais dentários biocompatíveis.

A par da necessidade de estudos comparativos, o constante desenvolvimento de novos materiais, tendo como objetivo a redução do tempo de trabalho e da sensibilidade à técnica, é atualmente altamente desejável. Assim, os compósitos auto-adesivos representam um conceito de elevado interesse clínico que tem sido considerado como o

sucessor dos compósitos convencionais (Hikita et al., 2007).

No presente estudo, o ensaio de MTT foi apenas realizado às 24 horas após a exposição das células aos extratos nas várias concentrações. Yildirim-Bicer et al. (2013) concluiu que o período mais citotóxico às células ocorre nas 24 horas após a exposição. No entanto, Tsitrou et al. (2014) observou que o tempo de exposição está correlacionado com valores aumentados de monómeros residuais, levando a valores mais elevados de citotoxicidade. Assim, mais pesquisas devem ser realizadas com o intuito de investigar a citotoxicidade a longo prazo, recorrendo simultaneamente a diferentes testes de citotoxicidade *in vitro*, fornecendo maior robustez às comparações.

Foi ainda possível verificar que, para concentrações elevadas de extrato, todos os grupos estudados demonstraram valores de atividade metabólica <70%, apresentando potencial citotóxico (ISO,10993-5:2009).

VII. Conclusão

A partir deste estudo é possível concluir-se que os monómeros funcionais presentes na formulação de resinas compostas em concentrações elevadas podem provocar a inibição da atividade metabólica e, conseqüentemente, tornar os materiais à base de resina citotóxicos. A alteração da atividade metabólica apresenta uma correlação com a concentração de extrato, indicando que concentrações mais reduzidas são menos prejudiciais às células.

Os monómeros que apresentaram maior redução da atividade metabólica foram o HEMA e o HEAA. Os extratos que continham as resinas com os monómeros GPDM, MDP e o grupo de controlo apresentaram valores de atividade metabólica semelhantes em concentrações elevadas.

São necessários mais estudos de citotoxicidade para complementar o presente estudo e determinar o grau de citotoxicidade de resinas auto-adesivas com monómeros funcionais na sua formulação.

VIII. Relevância clínica

O elevado interesse clínico na formulação de resinas compostas que permitam menor tempo de trabalho e uma sensibilidade à técnica mais reduzida torna o desenvolvimento de novos materiais restauradores bastante relevante. Apesar de preencherem requisitos desejáveis na prática clínica restauradora, várias composições de resinas compostas auto-adesivas anteriormente desenvolvidas apresentaram fracos resultados adesivos e resistência mecânica comprometida, sendo pertinente o desenvolvimento de novas formulações.

Por outro lado, estudos prévios revelam a inexistência de uma completa conversão monómero/polímero durante a reação de polimerização das resinas compostas convencionais. Por conseguinte, a libertação de monómeros não reagidos e o desgaste progressivo dos materiais restauradores conduzem a reações de citotoxicidade,

demonstrada em investigações prévias.

As resinas auto-adesivas apresentam monómeros funcionais na sua composição. A escassez de estudos *in vitro* de citotoxicidade de resinas auto-adesivas e a baixa robustez na comparação entre os mesmos, não permite concluir de forma consistente quais os monómeros funcionais que apresentam maior citotoxicidade.

Assim, a partir dos resultados da presente investigação foi possível comparar valores de atividade metabólica celular obtidos após a exposição a extratos de diferentes formulações de resinas auto-adesivas, permitindo avaliar a variação do monómero funcional e da concentração do mesmo, contribuindo para o desenvolvimento de novas formulações com maior biocompatibilidade.

IX. Perspetivas Futuras

Tendo em conta o trabalho desenvolvido, em investigações futuras será relevante:

- Avaliar a citotoxicidade das resinas auto-adesivas num ensaio de MTT considerando diferentes períodos de observação (1/2 h, 48 h e 72 h) e complementar com ensaio de sulforrodamina B (SRB) e alamar-azul
- Correlacionar os dados obtidos com o perfil de polimerização das resinas auto-adesivas
- Efetuar um estudo comparativo com um desenho fatorial, para diferentes monómeros de reticulação, a fim de determinar a concentração e mistura otimizada, com melhores resultados celulares

*Efeito da variação de monómeros funcionais na formulação de novas resinas auto-adesivas:
estudo de citotoxicidade*

X. Bibliografia

1. Al-Ahdal, K., Silikas, N., & Watts, D. C. (2014). Rheological properties of resin composites according to variations in composition and temperature. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 30(5), 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.02.005>
2. Almaroof, A., Niazi, S. A., Rojo, L., Mannocci, F., & Deb, S. (2017). Evaluation of dental adhesive systems incorporating an antibacterial monomer eugenyl methacrylate (EgMA) for endodontic restorations. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 33(5), e239–e254. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.01.016>
3. Alrahlah, A., Silikas, N., & Watts, D. C. (2014). Post-cure depth of cure of bulk fill dental resin-composites. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 30(2), 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.011>
4. Alvarez, M., Carvalho, R. G., Barbosa, S., Polassi, M. R., Nascimento, F. D., D'Alpino, P., & Tersariol, I. (2019). Oxidative stress induced by self-adhesive resin cements affects gene expression, cellular proliferation and mineralization potential of the MDPC-23 odontoblast-like cells. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 35(4), 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.02.008>
5. Asmussen, E., & Peutzfeldt, A. (2001). Influence of selected components on crosslink density in polymer structures. *European journal of oral sciences*, 109(4), 282–285. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2001.00057.x>
6. Baldion, P. A., Velandia-Romero, M. L., & Castellanos, J. E. (2021). Dental resin monomers induce early and potent oxidative damage on human odontoblast-like cells. *Chemico-Biological Interactions*, 333, 109336. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109336>
7. Bakopoulou, A., Papadopoulos, T., & Garefis, P. (2009). Molecular Toxicology of Substances Released from Resin-Based Dental Restorative Materials. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3861–3899. <https://doi.org/10.3390/ijms10093861>
8. Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Tsiftoglou, A., Garefis, P., Koidis, P., & Geurtsen, W. (2011). Effects of HEMA and TEDGMA on the in vitro odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived

- from deciduous teeth. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 27(6), 608–617. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.03.00>
9. Bationo, R., Rouamba, A., Diarra, A., Beugré-Kouassi, M., Beugré, J. B., & Jordana, F. (2021). Cytotoxicity evaluation of dental and orthodontic light-cured composite resins. *Clinical and experimental dental research*, 7(1), 40–48. <https://doi.org/10.1002/cre2.337>
10. Bayne, S., Ferracane, J., Marshall, G., Marshall, S., & van Noort, R. (2019). The Evolution of Dental Materials over the Past Century: Silver and Gold to Tooth Color and Beyond. *Journal of Dental Research*, 98(3), 257–265. <https://doi.org/10.1177/0022034518822808>
11. Becher, R., Kopperud, H. M., Al, R. H., Samuelsen, J. T., Morisbak, E., Dahlman, H. J., Lilleaas, E. M., & Dahl, J. E. (2006). Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 22(7), 630–640. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.05.013>
12. Bedran-Russo, A., Leme-Kraus, A. A., Vidal, C., & Teixeira, E. C. (2017). An Overview of Dental Adhesive Systems and the Dynamic Tooth-Adhesive Interface. *Dental clinics of North America*, 61(4), 713–731. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.001>
13. Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
14. Bianchi, L., Ribeiro, A. P., de Oliveira Carrilho, M. R., Pashley, D. H., de Souza Costa, C. A., & Hebling, J. (2013). Transdentineal cytotoxicity of experimental adhesive systems of different hydrophilicity applied to ethanol-saturated dentin. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 29(9), 980–990. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.006>
15. Bouillaguet, S., Virgillito, M., Wataha, J., Ciucchi, B., & Holz, J. (1998). The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. *Journal of oral rehabilitation*, 25(1), 45–51. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.1998.00205.x>

16. Brueckner, C., Schneider, H., & Haak, R. (2017). Shear Bond Strength and Tooth-Composite Interaction with Self-Adhering Flowable Composites. *Operative dentistry*, 42(1), 90–100. <https://doi.org/10.2341/15-365-L>
17. Caughman, W. F., Caughman, G. B., Shiflett, R. A., Rueggeberg, F., & Schuster, G. S. (1991). Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials*, 12(8), 737–740. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(91\)90022-3](https://doi.org/10.1016/0142-9612(91)90022-3)
18. Çelik, E. U., Aka, B., & Yilmaz, F. (2015). Six-month Clinical Evaluation of a Self-adhesive Flowable Composite in Noncarious Cervical Lesions. *The journal of adhesive dentistry*, 17(4), 361–368. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a34556>
19. Cooper, P. R., Takahashi, Y., Graham, L. W., Simon, S., Imazato, S., & Smith, A. J. (2010). Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of dentistry*, 38(9), 687–697. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.05.016>
20. Çelik, E. U., Aka, B., & Yilmaz, F. (2015). Six-month Clinical Evaluation of a Self-adhesive Flowable Composite in Noncarious Cervical Lesions. *The journal of adhesive dentistry*, 17(4), 361–368. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a34556>
21. Cohn-Inostroza, N., Ehrenfeld Slater, P., Pavicic Rojas, F., & De la Rosa Varela, C. (2015). Efeito citotóxico de BisGMA em cultivos celulares de fibroblastos humanos mediante ensaios de MTT. *Claves Odontol*, 15. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-775311?lang=es>
22. Costa, C. A., Vaerten, M. A., Edwards, C. A., & Hanks, C. T. (1999). Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 15(6), 434–441. [https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(99\)00071-8](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(99)00071-8)
23. Cheng, L., Weir, M. D., Xu, H. H., Antonucci, J. M., Kraigsley, A. M., Lin, N. J., Lin-Gibson, S., & Zhou, X. (2012). Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 28(5), 561–572. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.01.005>
24. Cheng, L., Zhang, K., Zhang, N., Melo, M., Weir, M. D., Zhou, X. D., Bai, Y. X., Reynolds, M. A., & Xu, H. (2017). Developing a New Generation of Antimicrobial and Bioactive Dental Resins. *Journal of dental research*, 96(8), 855–863. <https://doi.org/10.1177/0022034517709739>

25. D'Alpino, P., Moura, G., Barbosa, S., Marques, L. A., Eberlin, M. N., Nascimento, F. D., & Tersariol, I. (2017). Differential cytotoxic effects on odontoblastic cells induced by self-adhesive resin cements as a function of the activation protocol. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 33(12), 1402–1415. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.09.011>
26. Da Fonseca Roberti Garcia, L., Pontes, E. C., Basso, F. G., Hebling, J., de Souza Costa, C. A., & Soares, D. G. (2016). Transdental cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Clinical oral investigations*, 20(7), 1559–1566. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1630-1>
27. Darmani, H., Al-Hiyasat, AS, & Milhem, MM (2007). Citotoxicidade de compósitos dentários e seus componentes lixiviados. *Quintessence International (Berlim, Alemanha: 1985)*, 38 (9), 789-795. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17873986/>
28. Delgado, A., Jamal, H., Young, A., & Ashley, P. (2021). Scoping review of trials evaluating adhesive strategies in pediatric dentistry: where do simplified strategies lie? *BMC oral health*, 21(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01395-5>
29. Demarco, F. F., Collares, K., Correa, M. B., Cenci, M. S., Moraes, R. R., & Opdam, N. J. (2017). Should my composite restorations last forever? Why are they failing? *Brazilian oral research*, 31(suppl 1), e56. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0056>
30. Dewaele, M., Truffier-Boutry, D., Devaux, J., & Leloup, G. (2006). Volume contraction in photocured dental resins: The shrinkage-conversion relationship revisited. *Dental Materials*, 22(4), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.03.014>
31. Dewaele, M., Asmussen, E., Peutzfeldt, A., Munksgaard, E. C., Benetti, A. R., Finné, G., Leloup, G., & Devaux, J. (2009). Influence of curing protocol on selected properties of light-curing polymers: Degree of conversion, volume contraction, elastic modulus, and glass transition temperature. *Dental Materials*, 25(12), 1576–1584. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.08.001>
32. Dressano, D., Salvador, M. V., Oliveira, M. T., Marchi, G. M., Fronza, B. M., Hadis, M., Palin, W. M., & Lima, A. F. (2020). Chemistry of novel and contemporary resin-based dental adhesives. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 110, 103875. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103875>

33. Eliades, T. (2000). Degree of cure of orthodontic adhesives with various polymerization initiation modes. *The European Journal of Orthodontics*, 22(4), 395–399. <https://doi.org/10.1093/ejo/22.4.395>
34. Ergün, G., Eğılmez, F., Uçtaşı, M. B., & Yılmaz, S. (2007). Effect of light curing type on cytotoxicity of dentine-bonding agents. *International endodontic journal*, 40(3), 216–223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01225.x>
35. Ermis, R. B., Temel, U. B., Cellik, E. U., & Kam, O. (2010). Clinical performance of a two-step self-etch adhesive with additional enamel etching in Class III cavities. *Operative dentistry*, 35(2), 147–155. <https://doi.org/10.2341/09-089-C>
36. Ferracane, J. (1994). Elution of leachable components from composites. *Journal of Oral Rehabilitation*, 21(4), 441–452. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1994.tb01158.x>
37. Ferreira, M. B., Pereira, N., Marto, C. M., Cardoso, M., Amaro, I., Coelho, A., Saraiva, J., Spagnuolo, G., Marques Ferreira, M., Piñeiro, M., Pinho E Melo, T., Botelho, M. F., Carrilho, E., Paula, A., & Laranjo, M. (2022). Isolation and Identification of Cytotoxic Compounds Present in Biomaterial Life®. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(3), 871. <https://doi.org/10.3390/ma15030871>
38. Fisher, J., Varenne, B., Narvaez, D., & Vickers, C. (2018). The Minamata Convention and the phase down of dental amalgam. *Bulletin of the World Health Organization*, 96(6), 436–438. <https://doi.org/10.2471/blt.17.203141>
39. Franz, A., König, F., Lucas, T., Watts, D. C., & Schedle, A. (2009). Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. *Dental Materials*, 25(2), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.07.003>
40. Fu, J., Kakuda, S., Pan, F., Hoshika, S., Ting, S., Fukuoka, A., Bao, Y., Ikeda, T., Nakaoki, Y., Selimovic, D., Sano, H., & Sidhu, S. K. (2013). Bonding performance of a newly developed step-less all-in-one system on dentin. *Dental materials journal*, 32(2), 203–211. <https://doi.org/10.4012/dmj.2012-204>
41. Fugolin, A., & Pfeifer, C. S. (2017). New Resins for Dental Composites. *Journal of dental research*, 96(10), 1085–1091. <https://doi.org/10.1177/0022034517720658>
42. Garcia, I. M., Balhaddad, A. A., Ibrahim, M. S., Weir, M. D., Xu, H., Collares, F. M., & Melo, M. (2021). Antibacterial response of oral microcosm biofilm to nano-zinc oxide in adhesive resin. *Dental materials: official publication of the Academy*

- of *Dental Materials*, 37(3), e182–e193.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.11.022>
43. Geurtsen, W., Spahl, W., & Leyhausen, G. (1998). Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *Journal of dental research*, 77(12), 2012–2019.
<https://doi.org/10.1177/00220345980770121001>
44. Geurtsen W. (2000). Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 11(3), 333–355.
<https://doi.org/10.1177/10454411000110030401>
45. Giannini, M., Makishi, P., Ayres, A. P. A., Vermelho, P. M., Fronza, B. M., Nikaido, T., & Tagami, J. (2015). Self-Etch Adhesive Systems: A Literature Review. *Brazilian Dental Journal*, 26(1), 3–10. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302442>
46. Goldberg M. (2007). In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clinical oral investigations*, 12(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1007/s00784-007-0162-8>
47. Gupta, S. K., Saxena, P., Pant, V. A., & Pant, A. B. (2012). Release and toxicity of dental resin composite. *Toxicology international*, 19(3), 225–234.
<https://doi.org/10.4103/0971-6580.103652>
48. Halvorson, R. H., Erickson, R. L., & Davidson, C. L. (2003). The effect of filler and silane content on conversion of resin-based composite. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 19(4), 327–333.
[https://doi.org/10.1016/s0109-5641\(02\)00062-3](https://doi.org/10.1016/s0109-5641(02)00062-3)
49. Hayashi M. (2020). Adhesive Dentistry: Understanding the Science and Achieving Clinical Success. *Dental clinics of North America*, 64(4), 633–643.
<https://doi.org/10.1016/j.cden.2020.05.001>
50. He, J., Söderling, E., Vallittu, P. K., & Lassila, L. V. (2013). Investigation of double bond conversion, mechanical properties, and antibacterial activity of dental resins with different alkyl chain length quaternary ammonium methacrylate monomers (QAM). *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 24(5), 565–573. <https://doi.org/10.1080/09205063.2012.699709>

51. Hikita, K., Van Meerbeek, B., De Munck, J., Ikeda, T., Van Landuyt, K., Maida, T., Lambrechts, P., & Peumans, M. (2007). Bonding effectiveness of adhesive luting agents to enamel and dentin. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 23(1), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.12.002>
52. Hiraishi, N., Kitasako, Y., Nikaido, T., Foxton, R. M., Tagami, J., & Nomura, S. (2013). Acidity of conventional luting cements and their diffusion through bovine dentine. *International endodontic journal*, 36(9), 622–628. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00700.x>
53. Hirose, Y., Yamaguchi, M., Kawabata, S., Murakami, M., Nakashima, M., Gotoh, M., & Yamamoto, T. (2016). Effects of Extracellular pH on Dental Pulp Cells In Vitro. *Journal of endodontics*, 42(5), 735–741. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.01.019>
54. Högg, C., Maier, M., Dettinger-Maier, K., He, X., Rothmund, L., Kehe, K., Hickel, R., & Reichl, F. X. (2016). Effect of various light curing times on the elution of composite components. *Clinical oral investigations*, 20(8), 2113–2121. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1698-7>
55. Iftikhar, S., Jahanzeb, N., Saleem, M., Ur Rehman, S., Matinlinna, J. P., & Khan, A. S. (2021). The trends of dental biomaterials research and future directions: A mapping review. *The Saudi dental journal*, 33(5), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2021.01.002>
56. ISO (2009). ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for Cytotoxicity: In Vitro Methods. *International Organization for Standardization*, ISO 10993-5: 2009
57. ISO (2019). ISO 4049: Dentistry- Polymer- based restorative materials. *International Standard Organization*, ISO 4049:2019
58. Issa, Y., Watts, D. C., Brunton, P. A., Waters, C. M., & Duxbury, A. J. (2004). Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dental Materials*, 20, 12–20.
59. Jiang, R. D., Lin, H., Zheng, G., Zhang, X. M., Du, Q., & Yang, M. (2017). In vitro dentin barrier cytotoxicity testing of some dental restorative materials. *Journal of dentistry*, 58, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.01.003>
60. Khangura, S. D., Seal, K., Esfandiari, S., Quiñonez, C., Mierzwinski-Urban, M., Mulla, S. M., Laplante, S., Tsoi, B., Godfrey, C., Weeks, L., Helis, E., Wells, C.,

- Pullman, D., & Basu, N. (2018). Composite Resin Versus Amalgam for Dental Restorations: A Health Technology Assessment. *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health*.
61. Kim, EC, Park, H., Lee, SI, & Kim, SY (2015). Efeito do Monômero de Resina Dental Ácido 10-metacriloiloxidecil Dihidrogeno Fosfato na Diferenciação Odontoblástica de Células Pulmonares Dentárias Humanas. *Farmacologia e toxicologia básica e clínica*, 117 (5), 340–349. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12404>
62. Koulaouzidou, E. A., Helvatjoglu-Antoniades, M., Palaghias, G., Karanika-Kouma, A., & Antoniades, D. (2009). Cytotoxicity of dental adhesives in vitro. *European journal of dentistry*, 3(1), 3–9.
63. Kundie, F., Azhari, C. H., Muchtar, A., & Ahmad, Z. A. (2018). Effects of Filler Size on the Mechanical Properties of Polymer-filled Dental Composites: A Review of Recent Developments. *Journal of Physical Science*, 29(1), 141–165. <https://doi.org/10.21315/jps2018.29.1.10>
64. Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(6), 10.1101/pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
65. Krifka, S., Hiller, K. A., Spagnuolo, G., Jewett, A., Schmalz, G., & Schweikl, H. (2012). The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials*, 33(21), 5177–5186. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.013>
66. Langhorst, S. E., O'Donnell, J. N., & Skrtic, D. (2009). In vitro remineralization of enamel by polymeric amorphous calcium phosphate composite: quantitative microradiographic study. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 25(7), 884–891. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.01.094>
67. Luczaj-Cepowicz, E., Marczuk-Kolada, G., Pawinska, M., Obidzinska, M., & Holownia, A. (2017). Evaluation of cytotoxicity and pH changes generated by various dental pulp capping materials - an in vitro study. *Folia histochemica et cytobiologica*, 55(2), 86–93. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2017.0008>
68. Lührs, A. K., Guhr, S., Schilke, R., Borchers, L., Geurtsen, W., & Günay, H. (2008). Shear bond strength of self-etch adhesives to enamel with additional

- phosphoric acid etching. *Operative dentistry*, 33(2), 155–162. <https://doi.org/10.2341/07-63>
69. Maas, M. S., Natale, L. C., Rodrigues, M. C., Watts, D. C., Braga, R. R., & Alania, Y. (2017). Trends in restorative composites research: what is in the future? *Brazilian Oral Research*, 31(1), 23-36. [doi:10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0055](https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0055)
70. Malacarne, J., Carvalho, R. M., de Goes, M. F., Svizero, N., Pashley, D. H., Tay, F. R., Yiu, C. K., & Carrilho, M. R. (2006). Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 22(10), 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.11.020>
71. Malterud M. I. (2006). Minimally invasive restorative dentistry: a biomimetic approach. *Practical procedures & aesthetic dentistry: PPAD*, 18(7), 409–414.
72. Manhart, J., Chen, H. Y., & Hickel, R. (2001). The suitability of packable resin-based composites for posterior restorations. *The Journal of the American Dental Association*, 132(5), 639–645. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2001.0241>
73. Manojlovic, D., Radisic, M., Vasiljevic, T., Zivkovic, S., Lausevic, M., & Miletic, V. (2011). Monomer elution from nanohybrid and ormocer-based composites cured with different light sources. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 27(4), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.11.017>
74. Manso, A. P., & Carvalho, R. M. (2017). Dental Cements for Luting and Bonding Restorations: Self-Adhesive Resin Cements. *Dental clinics of North America*, 61(4), 821–834. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.006>
75. Mine, A., De Munck, J., Van Ende, A., Poitevin, A., Matsumoto, M., Yoshida, Y., Kuboki, T., Van Landuyt, K. L., Yatani, H., & Van Meerbeek, B. (2017). Limited interaction of a self-adhesive flowable composite with dentin/enamel characterized by TEM. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 33(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.11.010>
76. Mishra S. (2016). FDA, CE mark or something else? -Thinking fast and slow. *Indian heart journal*, 69(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2016.11.327>
77. Moharamzadeh, K., Van Noort, R., Brook, I. M., & Scutt, A. M. (2007). Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 23(1), 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.11.039>

78. Moszner, N., Salz, U., & Zimmermann, J. (2005). Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 21(10), 895–910. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.05.001>
79. Moszner, N., & Hirt, T. (2012). New polymer-chemical developments in clinical dental polymer materials: Enamel-dentin adhesives and restorative composites. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50(21), 4369–4402. <https://doi.org/10.1002/pola.26260>
80. Nagarkar, S., Theis-Mahon, N., & Perdigão, J. (2019). Universal dental adhesives: Current status, laboratory testing, and clinical performance. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(6), 2121–2131. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34305>
81. Nascimento, G. G., Correa, M. B., Opdam, N., & Demarco, F. F. (2013). Do clinical experience time and postgraduate training influence the choice of materials for posterior restorations? Results of a survey with Brazilian general dentists. *Brazilian dental journal*, 24(6), 642–646. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302361>
82. Nascimento, Armiliana & Lima, Eliane & Sousa, Yasmine & Aguiar, Jaciana & Silva, Teresina & Braz, Rodivan. (2017). Citotoxicidade de diferentes resinas compostas: um estudo “in vitro” em cultura de macrófagos murine.. *Revista da Faculdade de Odontologia de Lins*. 27. <https://doi.org/10.15600/2238-1236/fo1.v27n2p17-25>
83. Noronha Filho, J. D., Brandão, N. L., Poskus, L. T., Guimarães, J. G., & Silva, E. M. (2010). A critical analysis of the degree of conversion of resin-based luting cements. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 18(5), 442–446. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572010000500003>
84. Opdam, N. J., van de Sande, F. H., Bronkhorst, E., Cenci, M. S., Bottenberg, P., Pallesen, U., Gaengler, P., Lindberg, A., Huysmans, M. C., & van Dijken, J. W. (2014). Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. *Journal of dental research*, 93(10), 943–949. <https://doi.org/10.1177/0022034514544217>

85. Oshida, Y., Hashem, A., & Elsalawy, R. (1995). Algumas observações mecanicistas em resinas compostas dentárias deterioradas pela água. *Materiais biomédicos e engenharia*, 5 (2), 93–115.
86. Özcan, M., & Volpato, C. (2020). Current perspectives on dental adhesion: (3) Adhesion to intraradicular dentin: Concepts and applications. *The Japanese dental science review*, 56(1), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2020.08.002>
87. Pagano, S., Lombardo, G., Balloni, S., Bodo, M., Cianetti, S., Barbati, A., Montaseri, A., & Marinucci, L. (2019). Cytotoxicity of universal dental adhesive systems: Assessment in vitro assays on human gingival fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 60, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.06.009>
88. Paula, A. B., Toste, D., Marinho, A., Amaro, I., Marto, C. M., Coelho, A., Marques-Ferreira, M., & Carrilho, E. (2019). Once Resin Composites and Dental Sealants Release Bisphenol-A, How Might This Affect Our Clinical Management? -A Systematic Review. *International journal of environmental research and public health*, 16(9), 1627. <https://doi.org/10.3390/ijerph16091627>
89. Paula, A. B., Laranjo, M., Coelho, A. S., Abrantes, A. M., Gonçalves, A. C., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Ferreira, M. M., Botelho, M. F., Marto, C. M., & Carrilho, E. (2021). Assessing the Cytotoxicity and Cell Response to Biomaterials. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (173), 10.3791/61512. <https://doi.org/10.3791/61512>
90. Pashley, D. H., Tay, F. R., Breschi, L., Tjäderhane, L., Carvalho, R. M., Carrilho, M., & Tezvergil-Mutluay, A. (2011). State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 27(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>
91. Park, H. J., Lyons, J. C., Ohtsubo, T., & Song, C. W. (1999). Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *British journal of cancer*, 80(12), 1892–1897. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690617>
92. Peumans, M., De Munck, J., Mine, A., & Van Meerbeek, B. (2014). Clinical effectiveness of contemporary adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions. A systematic review. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 30(10), 1089–1103. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.07.007>
93. Peumans, M., Kanumilli, P., De Munck, J., Van Landuyt, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2005). Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a

- systematic review of current clinical trials. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 21(9), 864–881. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.02.003>
94. Perdigão, J., Geraldeli, S., & Hodges, J. S. (2003). Total-etch versus self-etch adhesive: effect on postoperative sensitivity. *Journal of the American Dental Association* (1939), 134(12), 1621–1629. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2003.010>
95. Perdigão J. (2007). New developments in dental adhesion. *Dental clinics of North America*, 51(2), 333–viii. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2007.01.001>
96. Perdigão J. (2020). Current perspectives on dental adhesion: (1) Dentin adhesion - not there yet. *The Japanese dental science review*, 56(1), 190–207. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2020.08.004>
97. Pfeifer, C. S. (2017). Polymer-Based Direct Filling Materials. *Dental Clinics of North America*, 61(4), 733–750. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.002>
98. Poitevin, A., De Munck, J., Van Ende, A., Suyama, Y., Mine, A., Peumans, M., & Van Meerbeek, B. (2013). Bonding effectiveness of self-adhesive composites to dentin and enamel. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 29(2), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.10.001>
99. Reichl, F. X., Seiss, M., Marquardt, W., Kleinsasser, N., Schweikl, H., Kehe, K., & Hickel, R. (2008). Toxicity potentiation by H₂O₂ with components of dental restorative materials on human oral cells. *Archives of toxicology*, 82(1), 21–28. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0226-1>
100. Rengo, C., Goracci, C., Juloski, J., Chieffi, N., Giovannetti, A., Vichi, A., & Ferrari, M. (2012). Influence of phosphoric acid etching on microleakage of a self-etch adhesive and a self-adhering composite. *Australian dental journal*, 57(2), 220–226. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2012.01689.x>
101. Salehi, S., Gwinner, F., Mitchell, J. C., Pfeifer, C., & Ferracane, J. L. (2015). Cytotoxicity of resin composites containing bioactive glass fillers. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 31(2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.12.004>
102. Sancakli, H. S., Yildiz, E., Bayrak, I., & Ozel, S. (2014). Effect of different adhesive strategies on the post-operative sensitivity of class I composite

- restorations. *European journal of dentistry*, 8(1), 15–22. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.126234>
103. Schmalz, G., Hickel, R., van Landuyt, K. L., & Reichl, F. X. (2018). Scientific update on nanoparticles in dentistry. *International dental journal*, 68(5), 299–305. <https://doi.org/10.1111/idj.12394>
104. Schweikl, H., Spagnuolo, G., & Schmalz, G. (2006). Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of dental research*, 85(10), 870–877. <https://doi.org/10.1177/154405910608501001>
105. Schneider, T. R., Hakami-Tafreshi, R., Tomasino-Perez, A., Tayebi, I., & Lobner, D. (2019). Effects of dental composite resin monomers on dental pulp cells. *Dental materials journal*, 38(4), 579–583. <https://doi.org/10.4012/dmj.2018-163>
106. Sideridou, I. D., & Achilias, D. S. (2005). Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 74(1), 617–626. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30252>
107. Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R. K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M. O., Herman, J. G., Baylin, S. B., Sidransky, D., Gabrielson, E., Brock, M. V., & Biswal, S. (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS medicine*, 3(10), e420. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030420>
108. Şişmanoğlu, S., Demirci, M., Schweikl, H., Ozen-Eroglu, G., Cetin-Aktas, E., Kuruca, S., Tuncer, S., & Tekce, N. (2020). Cytotoxic effects of different self-adhesive resin cements: Cell viability and induction of apoptosis. *The journal of advanced prosthodontics*, 12(2), 89–99. <https://doi.org/10.4047/jap.2020.12.2.89>
109. Soares, C. J., Faria-E-Silva, A. L., Rodrigues, M. P., Vilela, A., Pfeifer, C. S., Tantbirojn, D., & Versluis, A. (2017). Polymerization shrinkage stress of composite resins and resin cements - What do we need to know?. *Brazilian oral research*, 31(suppl 1), e62. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0062>
110. Sofan, E., Sofan, A., Palaia, G., Tenore, G., Romeo, U., & Migliau, G. (2017). Classification review of dental adhesive systems: from the IV generation to the universal type. *Annali di stomatologia*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.11138/ads/2017.8.1.001>

111. Spencer, P., Ye, Q., Park, J., Topp, E. M., Misra, A., Marangos, O., Wang, Y., Bohaty, B. S., Singh, V., Sene, F., Eslick, J., Camarda, K., & Katz, J. L. (2010). Adhesive/Dentin Interface: The Weak Link in the Composite Restoration. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(6), 1989–2003. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-9969-6>
112. Strazzi-Sahyon, H. B., Rocha, E. P., Assunção, W. G., & Dos Santos, P. H. (2020). Influence of Light-Curing Intensity on Color Stability and Microhardness of Composite Resins. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*, 40(1), 129–134. <https://doi.org/10.11607/prd.4437>
113. Styllou, M., Reichl, F. X., Styllou, P., Urcan, E., Rothmund, L., Hickel, R., Högg, C., & Scherthan, H. (2015). Dental composite components induce DNA-damage and altered nuclear morphology in gingiva fibroblasts. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 31(11), 1335–1344. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.08.156>
114. Takamiya, H., Tsujimoto, A., Teixeira, E. C., Jurado, C. A., Takamizawa, T., Barkmeier, W. W., Latta, M. A., Miyazaki, M., & Garcia-Godoy, F. (2021). Bonding and wear properties of self-adhesive flowable restorative materials. *European journal of oral sciences*, 129(5), e12799. <https://doi.org/10.1111/eos.12799>
115. Takeshige, F., Kawakami, Y., Hayashi, M., & Ebisu, S. (2007). Fatigue behavior of resin composites in aqueous environments. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 23(7), 893–899. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.031>
116. Tay, F. R., Frankenberger, R., Carvalho, R. M., & Pashley, D. H. (2005). Pit and fissure sealing. Bonding of bulk-cured, low-filled, light-curing resins to bacteria-contaminated uncut enamel in high c-factor cavities. *American journal of dentistry*, 18(1), 28–36.
117. Teshima I. (2010). Degradation of 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate. *Journal of dental research*, 89(11), 1281–1286. <https://doi.org/10.1177/0022034510379018>
118. Tjäderhane L. (2015). Dentin bonding: can we make it last? *Operative dentistry*, 40(1), 4–18. <https://doi.org/10.2341/14-095-BL>

119. Tseng, W. Y., Huang, C. H., Chen, R. S., Lee, M. S., Chen, Y. J., Rueggeberg, F. A., & Chen, M. H. (2007). Monomer conversion and cytotoxicity of dental composites irradiated with different modes of photoactivated curing. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 83(1), 85–90. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30769>
120. Tsi trou, E., Kelogrigoris, S., Koulaou zidou, E., Anton iades-Halvatjoglou, M., Koliniotou-Koumpia, E., & van Noort, R. (2014). Effect of extraction media and storage time on the elution of monomers from four contemporary resin composite materials. *Toxicology international*, 21(1), 89–95. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.128811>
121. Unemori, M., Matsuya, Y., Akashi, A., Goto, Y., & Akamine, A. (2004). Self-etching adhesives and postoperative sensitivity. *American journal of dentistry*, 17(3), 191–195.
122. Van Landuyt, K. L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2007). Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 28(26), 3757–3785. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.044>
123. Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., et al. (2003) Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Operative dentistry*. 28 (3), pp. 215–235.
124. Van Meerbeek, B., Peumans, M., Poitevin, A., Mine, A., Van Ende, A., Neves, A., & De Munck, J. (2010). Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 26(2), e100–e121. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.148>
125. Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., J., D. M., & K.L., V. L. (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials*, 27(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.023>
126. Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Van Landuyt, K., Yoshida, Y., & Peumans, M. (2020). From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *The journal of adhesive dentistry*, 22(1), 7–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a43994>

127. Versluis, A., & Tantbirojn, D. (2009). Relação entre encolhimento e estresse. Em A. Daskalaki (Ed.), *Dental Computing and Applications: Advanced Techniques for Clinical Dentistry* (pp. 45-64). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-60566-292-3.ch003>
128. Vichi, A., Margvelashvili, M., Goracci, C., Papacchini, F., & Ferrari, M. (2013). Bonding and sealing ability of a new self-adhering flowable composite resin in class I restorations. *Clinical Oral Investigations*, 17(6), 1497–1506. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0846-6>
129. Viotti, R. G., Kasaz, A., Pena, C. E., Alexandre, R. S., Arrais, C. A., & Reis, A. F. (2009). Microtensile bond strength of new self-adhesive luting agents and conventional multistep systems. *The Journal of prosthetic dentistry*, 102(5), 306–312. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(09\)60180-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(09)60180-3)
130. Xie, D., Weng, Y., Guo, X., Zhao, J., Gregory, R. L., & Zheng, C. (2011). Preparation and evaluation of a novel glass-ionomer cement with antibacterial functions. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 27(5), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.02.006>
131. Yiu, C. K., King, N. M., Pashley, D. H., Suh, B. I., Carvalho, R. M., Carrilho, M. R., & Tay, F. R. (2004). Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials*, 25(26), 5789–5796. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.026>
132. Yildirim-Bicer, A. Z., Ergun, G., Egilmez, F., & Demirkoprulu, H. (2013). In vitro cytotoxicity of indirect composite resins: effect of storing in artificial saliva. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*, 24(1), 81–86. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.114962>
133. Yoshii E. (1997). Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *Journal of biomedical materials research*, 37(4), 517–524. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19971215\)37:4<517::aid-jbm10>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19971215)37:4<517::aid-jbm10>3.0.co;2-5)
134. Yoshihara, K., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Hayakawa, S., Okihara, T., De Munck, J., Maruo, Y., Nishigawa, G., Minagi, S., Osaka, A., & Van Meerbeek, B. (2013). Adhesive interfacial interaction affected by different carbon-chain monomers. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 29(8), 888–897. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.05.006>

135. Yoshihara, K., Nagaoka, N., Hayakawa, S., Okihara, T., Yoshida, Y., & Van Meerbeek, B. (2018). Chemical interaction of glycerol-phosphate dimethacrylate (GPDM) with hydroxyapatite and dentin. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 34(7), 1072–1081. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.04.003>
136. Wawrzynkiewicz, A., Rozpedek-Kaminska, W., Galita, G., Lukomska-Szymanska, M., Lapinska, B., Sokolowski, J., & Majsterek, I. (2020). The Cytotoxicity and Genotoxicity of Three Dental Universal Adhesives—An In Vitro Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3950. <https://doi.org/10.3390/ijms21113950>
137. Wegehaupt, F. J., Lunghi, N., Belibasakis, G. N., & Attin, T. (2016). Influence of light-curing distance on degree of conversion and cytotoxicity of etch-and-rinse and self-etch adhesives. *BMC oral health*, 17(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0239-3>
138. Zhang, K., Melo, M. A., Cheng, L., Weir, M. D., Bai, Y., & Xu, H. H. (2012). Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 28(8), 842–852. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.027>

*Efeito da variação de monómeros funcionais na formulação de novas resinas auto-adesivas:
estudo de citotoxicidade*

ANEXOS

Anexo I



Comissão de Ética EGAS MONIZ

Proc. Interno nº 1060

Ex.ma Senhora
Marta Freire Neves dos Santos

Monte de Caparica, 24 de fevereiro de 2022.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado **"Efeito da variação de monómeros funcionais na formulação de novas resinas auto-adesivas: estudo de citotoxicidade"**, foi aprovado por unanimidade.

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz


Prof. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

Anexo II



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

INSTITUTO DE BIOFÍSICA

Declaração

Para os devidos efeitos se declara que Marta Neves dos Santos, aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Universitário Egas Moniz (Caparica, Lisboa), tem condições para realizar a parte experimental do seu projeto no âmbito da citotoxicidade de novas resinas adesivas para aplicação em medicina dentária, no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, no qual sou Diretora.

Coimbra, 5 de janeiro de 2022

Profª Doutora Maria Filomena Botelho
(Diretora do Instituto de Biofísica da FMUC)

Anexo III



Autorização para realização de trabalho de projeto final do Mestrado Integrado em Medicina Dentária no laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz

Declara-se que o aluno Marta Freire Neves dos Santos (112947) pode utilizar o Laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz para realização da investigação intitulada “Efeito da variação de monómeros funcionais na formulação de novas resinas auto-adesivas: estudo de citotoxicidade”.

A utilização do laboratório somente poderá ser efetuada dentro do horário a estipular para cada projeto.

Monte da Caparica,de de 2021

O Diretor do Laboratório de Biomateriais
(Prof. Doutor Mário Polido)

Assinado por: **MÁRIO HUMBERTO DOS SANTOS**
CRUZ POLIDO
Num. de Identificação: 05329287
Data: 2021.11.16 16:11:53+00'00'



Anexo IV



