

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DENTÍSTICA RESTAURADORA**

BRUNA FORTES BITTENCOURT CUNHA

**EFEITO DO CO-INICIADOR 4,4`BIS-DIMETILAMINOBENZIDROL NO GRAU DE
CONVERSÃO E PROPRIEDADES MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UMA
RESINA COMPOSTA EXPERIMENTAL**

**PONTA GROSSA
2014**

BRUNA FORTES BITTENCOURT CUNHA

**EFEITO DO CO-INICIADOR 4,4`BIS-DIMETILAMINO BENZIDROL NO GRAU DE
CONVERSÃO E PROPRIEDADES MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UMA
RESINA COMPOSTA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada para obtenção de título de Doutora na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Doutorado em Odontologia – Área de Concentração em Dentística Restauradora.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Osnara Maria Mongrue Gomes.

Co-Orientadores: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, Prof. Dr. Luís Antonio Pinheiro e Prof. Dr. João Carlos Gomes.

**PONTA GROSSA
2014**

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

C972 Cunha, Bruna Fortes Bittencourt
 Efeito do co-iniciador 4,4`bis-dimetilaminobenzidrol no grau de
 conversão e propriedades mecânicas e biológicas de uma resina
 composta experimental/ Bruna Fortes Bittencourt Cunha. Ponta
 Grossa, 2014.
 113 f.

 Tese (Doutorado em Odontologia – área de concentração :
 Dentística Restauradora) , Universidade Estadual de Ponta
 Grossa

 Orientadora: Profa. Dra. Osnara Maria Mongruel Gomes
 Coorientadores: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
 Prof. Dr. Luís Antonio Pinheiro
 Prof. Dr. João Carlos Gomes

 1. Resinas compostas. 2. Produtos com ação antimicrobiana.
 3. Análise espectral Raman. 4. Espectroscopia infravermelho
 Transformada de Fourier. 5. Propriedades físicas e químicas.
 I. Gomes, Osnara Maria Mongruel. II. Farago, Paulo Vitor. III.
 Pinheiro, Luís Antonio. IV. Gomes, João Carlos. V. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em Odontologia. VI. T.

CDD : 617.6

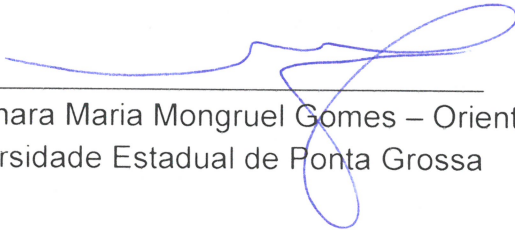
TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNA FORTES BITTENCOURT CUNHA

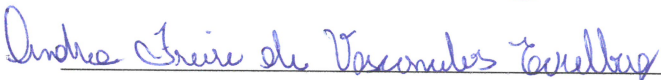
EFEITO DO CO-INICIADOR 4,4-BIS-DIMETILAMINO BENZIDROL NO GRAU DE CONVERSÃO E PROPRIEDADES MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UMA RESINA COMPOSTA EXPERIMENTAL

Tese apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutora na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Doutorado em Odontologia – Área de concentração em Dentística Restauradora.

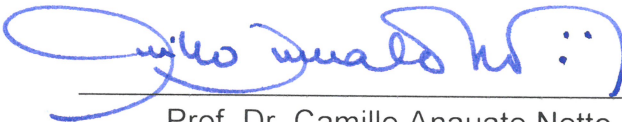
Ponta Grossa, 17 de novembro de 2014.



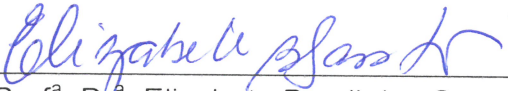
Prof^a. Dr^a. Osnara Maria Mongruel Gomes – Orientadora
Universidade Estadual de Ponta Grossa



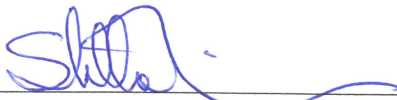
Prof^a. Dr^a. Andrea Freire de Vasconcelos
Pontifícia Universidade Católica do Paraná



Prof. Dr. Camillo Anauate Netto
Universidade Anhanguera de São Paulo



Prof^a. Dr^a. Elizabete Brasil dos Santos
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof^a. Dr^a. Stella Kossatz Pereira
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico essa tese aos meus pais, Isabel e Luiz, meus maiores incentivadores do estudo. Não só ensinaram-me os primeiros passos, mas, mais importante: guiaram-me pelo caminho correto. Agradeço todos os dias a Deus por me colocar nessa família! Vocês são a minha paixão!

Também ao meu marido Daniel. Você é minha paz, meu amor e meu amigo em qualquer circunstância. É o melhor conselho e meu porto seguro. A pessoa que me estimula a crescer e seguir em frente.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me enche com seu espírito e endireita os meus caminhos, todos os dias de minha vida. O Senhor é a força da minha fé, que me faz acreditar na paz e no amor e ter esperança. Porque *“sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus...”* (Romanos 8.28).

A minha irmã Heloísa e ao meu irmão Luizinho. Tenho a sorte de ter irmãos como vocês! Grandes amigos e companheiros! Vocês são muito importantes para mim!

A minha orientadora, “tia” e madrinha, Profa. Dra. Osnara Maria Mongruel Gomes, a qual admiro mais a cada dia. Seu coração é enorme, e sua competência infinita. Obrigada pela sua confiança e suas (eternas) contribuições em todos os trabalhos que realizamos. A senhora é e sempre será meu maior exemplo!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, o qual foi imprescindível para a execução desse trabalho. Do planejamento à conclusão da Tese, nada teria acontecido se não fosse o seu conhecimento e comprometimento. Fazia-me entender com clareza todos os testes e reações químicas com os compostos do estudo. Obrigada pela sua atenção, amizade e dedicação!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luís Antonio Pinheiro, que realizou os testes estatísticos dessa Tese, além da sua enorme contribuição no pedido de Patente. Agradeço seu auxílio e por tudo que me ensinou nas nossas reuniões, mas, sobretudo, agradeço pela disponibilidade, paciência e serenidade, até quando as coisas não davam certo! Obrigada sempre!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. João Carlos Gomes, exemplo de mestre, cidadão, pai, e muitas outras qualidades que lhe podem ser atribuídas. Sinto-me privilegiada de poder contar com sua sabedoria e auxílio em todas as minhas decisões profissionais até então. Ter o seu apoio e amizade é uma honra pra mim!

A minha dupla e colega John Alexis Dominguez, grande amigo e parceiro nesse trabalho. Como sempre dizemos: nosso trabalho é feito com alegria! E é desse jeito que trabalhamos! Só assim poderia ter dado tão certo! John, conte sempre comigo, e que Deus te ilumine e te cubra de bênçãos por toda sua jornada!

A querida Profa. Dra. Elizabete Brasil dos Santos, a qual não mediu esforços para me auxiliar nos testes microbiológicos. Agradeço muito seu tempo, colaboração, dedicação e por torcer comigo pra que todos os testes saíssem como o planejado!

A Profa. Dra. Giovana Mongruel Gomes, que me auxiliou na correção do texto da Tese. Minha querida amiga de infância, sua amizade é muito importante pra mim!!!! Obrigada por sempre ouvir meus desabafos, e me dar conselhos quando preciso! Que possamos continuar trabalhando juntas por muito tempo!!

A Doutoranda Leticia Antonelo Campos, que me auxiliou no teste de citotoxicidade e na correção do tópico sobre esse tema. Obrigada pelo tempo dispensado (inclusive aos domingos!) e pelo conhecimento transmitido!

Ao Milton, pela valiosíssima ajuda nos testes mecânicos. Uma pessoa admirável, tanto pela inteligência como pela alegria! Com você as risadas eram garantidas! Obrigada pelo seu comprometimento, amizade e parceria!

A Simone Sabino, por dedicar seu tempo, sua experiência nos aparelhos do LABMU, além de me esclarecer prontamente todas as minhas dúvidas sobre o Infravermelho e o micro-Raman.

Aos alunos de PIBIC, Thaís Franz, Diego Carvalho e Charles Rauen, pela contribuição nas fases experimentais e auxílio na confecção dos espécimes do Experimento 1.

A querida Morgana das Graças Procz dos Santos, secretária do PPGO, a qual sempre com um sorriso, estava disposta a ajudar e solucionar todos nossos problemas, com atenção e carinho.

Ao Luis Canteri, técnico do Laboratório do PPGO, agradeço pela prestatividade e dinamismo apresentada quando lhe solicitava ajuda.

A Esstech Inc., pela doação das partículas de carga silanizadas utilizadas no Experimento 1.

A Universidade Anhanguera de São Paulo – UNIAN, na pessoa do Prof. Dr. Camillo Anauate Netto e Profa. Dra. Roberta Alonso, pela gentil cooperação no

Experimento 2, cedendo equipamentos necessários para a realização do mesmo, bem como pela hospitalidade com que receberam o John e eu quando visitamos a Instituição.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa, na pessoa do seu reitor Prof. Dr. João Carlos Gomes e posteriormente Prof. Dr. Carlos Luciano Vargas, pela oportunidade de cursar a faculdade e o Mestrado numa Universidade tão reconhecida e qualificada.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Osnara Maria Mongruel Gomes, e posteriormente Profa. Dra. Denise Wambier, pela formação concedida e por poder contar com um excelente grupo docente.

Se, porém, algum de vós necessita de sabedoria, peça-a a Deus, que a todos dá liberalmente e nada lhes impropere; e ser-lhe-á concedida. Peça-a, porém, com fé, em nada duvidando; pois o que duvida é semelhante à onda do mar, impelida e agitada pelo vento.

Tiago 1.5-6.

DADOS CURRICULARES

Bruna Fortes Bittencourt Cunha

NASCIMENTO 25.04.1987	Curitiba, Paraná – Brasil
FILIAÇÃO	Isabel Cristina Fortes Bittencourt Luiz Carlos Derbli Bittencourt
2005 – 2009	Curso de Graduação em Odontologia Universidade Estadual de Ponta Grossa – (UEPG). Ponta Grossa – PR, Brasil.
2009 – 2009	Curso de Aperfeiçoamento em Implantodontia. Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais (CESCAGE). Ponta Grossa – PR, Brasil.
2010 – 2011	Curso de Especialização em Dentística Restauradora. Escola de Aperfeiçoamento Profissional. Associação Brasileira de Odontologia – Regional Ponta Grossa – PR, Brasil.
2010 – 2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Dentística Restauradora. Nível Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – PR, Brasil.
2012 – 2014	Curso em andamento de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Dentística Restauradora. Nível Doutorado. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – PR, Brasil.

RESUMO

BITTENCOURT BF. EFEITO DO CO-INICIADOR 4,4'-BIS-DIMETILAMINOBENZIDROL NO GRAU DE CONVERSÃO E PROPRIEDADES MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UMA RESINA COMPOSTA EXPERIMENTAL. [Tese Doutorado em Dentística Restauradora]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2014.

O objetivo desse estudo foi analisar 1) o efeito do co-iniciador alternativo 4,4'-bis-dimetilaminobenzidrol (BZN) no grau de conversão (GC) e nas propriedades mecânicas e biológicas de resinas compostas experimentais e 2) a correlação entre metodologias empregadas para o teste de GC de resinas compostas. Para o Experimento 1, o co-iniciador BZN foi utilizado em três concentrações (0,2, 0,5 e 1,2), e o co-iniciador DMAEMA como controle, nas mesmas concentrações acima. A concentração molar entre canforoquinona (CQ) e os co-iniciadores foi mantida constante (1:1). As resinas compostas foram manipuladas e submetidas aos testes de microdureza (VHN), resistência à compressão e flexural (em MPa), módulo de elasticidade (em GPa), GC (em %, por meio de espectroscopia micro-Raman e FT-IR com KBr), citotoxicidade *in vitro* (frente às células fibroblásticas 3T3) e avaliação *in vitro* da aderência de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* sobre as resinas experimentais. Para o Experimento 2, foram utilizadas as três resinas experimentais com DMAEMA (DMAEMA0,2, DMAEMA0,5 e DMAEMA1,2) foram submetidas a três testes para avaliação de GC: espectroscopia micro-Raman, Infravermelho por transformada de Fourier com aparelho de refletância total atenuada (FT-IR ATR) e FT-IR com confecção de pastilhas de KBr (FT-IR KBr). Os resultados do Experimento 1 foram submetidos ao teste ANOVA 1 fator e pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$) e os dados do Experimento 2 foram analisados por ANOVA 2 fatores (concentração do co-iniciador x metodologia) e pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$), e a correlação entre as três metodologias foi analisada por regressão linear múltipla. A significância da regressão e das variáveis independentes foi estimada por teste F e t, respectivamente, com 95% de confiança. Os resultados do Experimento 1 mostraram que as resinas compostas experimentais com o BZN apresentaram GC e propriedades mecânicas satisfatórias, além de serem consideradas atóxicas a fibroblastos 3T3. Ainda, a avaliação de aderência de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* revelou que as resinas com BZN apresentaram alto grau de inibição em diluição, comparado ao controle DMAEMA; para o Experimento 2, o GC das resinas compostas com o co-iniciador DMAEMA em diferentes concentrações não apresentou diferenças; porém, as três metodologias estudadas apresentaram forte correlação positiva ($r^2:0,95$). Conclui-se que a inclusão do co-iniciador BZN fornece potencial antimicrobiano à resina composta, sem comprometer o grau de conversão e as propriedades mecânicas da mesma. E que as três metodologias estudadas influenciaram os valores obtidos de GC, na sequência: micro-Raman > FT-IR ATR > FT-IR com KBr.

Palavras-chave: Resinas Compostas. Produtos com Ação Antimicrobiana. Análise Espectral Raman. Espectroscopia Infravermelho Transformada de Fourier. Propriedades Físicas e Químicas.

ABSTRACT

BITTENCOURT BF. EFFECT OF THE COINITIATOR 4,4'-BIS-DIMETHYLAMINO BENZYL DROLOL IN DEGREE OF CONVERSION AND IN MECHANICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF AN EXPERIMENTAL RESIN COMPOSITE. [Tese Doutorado em Dentística Restauradora]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2014.

The aim of this study was to examine 1) the effect of the alternative coinitiator 4,4'-bis dimethylaminobenzyl drolo (BZN) in degree of conversion (DC) and mechanical and biological properties of experimental resin composites and 2) the correlation between methods used to analyze DC of resin composites. In Experiment 1, the coinitiator BZN was used in three concentrations (0.2, 0.5 and 1.2), and the coinitiator DMAEMA as control at the same concentrations as above. The molar concentration of camphorquinone (CQ) and coinitiators was kept constant (1:1). The composites were manipulated and submitted to microhardness test (VHN), flexural and compressive strength (in MPa), elastic modulus (GPa), DC (in %, by micro-Raman spectroscopy and FT-IR), *in vitro* cytotoxicity (against 3T3 fibroblastic cells) and *in vitro* evaluation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* adhesion on the experimental resins. In Experiment 2, the three experimental resins with DMAEMA (DMAEMA0.2, DMAEMA0.5 and DMAEMA1.2) were used. The groups were subjected to three tests to assess DC: micro-Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FT-IR ATR) and FT-IR with preparation of KBr pellets (FT-IR KBr). The results of Experiment 1 were subjected to one-way ANOVA and Tukey post-test ($\alpha = 0.05$) and data from Experiment 2 were analyzed by two-way ANOVA (coinitiator concentration *versus* methodology) and Tukey post-test ($\alpha = 0.05$). The correlation between the three methods was analyzed by multiple linear regression. The significance of the regression and the independent variables was estimated by F and *t* tests, with 95% of confidence. The results of Experiment 1 showed that the experimental composite resin with BZN showed satisfactory DC and mechanical properties, and was considered nontoxic against 3T3 fibroblasts. Also, the evaluation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* adhesion revealed that BZN resins exhibited a high degree of inhibition compared to control resins with DMAEMA; for Experiment 2, DC of composites with DMAEMA at the three different concentrations did not show significant differences; however, the three methodologies analyzed showed a strong positive correlation (r^2 : 0.95). It was concluded that the inclusion of the coinitiator BZN provides antimicrobial potential to resin composites, without compromising degree of conversion and mechanical properties. Also, the three methodologies influenced DC values, as follows: micro-Raman > FT-IR ATR > FT-IR with KBr.

Key words: Composite resins. Products with antimicrobial action. Raman spectrum analysis. Fourier transformed infrared spectroscopy. Physical and chemical properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fórmula molecular do composto estudado 4,4`bisdimetilaminobenzidrol (BZN).....	22
Figura 2	Homogeneizadora de alta potência para mistura dos compósitos.....	23
Figura 3	Matrizes metálicas preenchidas por resina composta.....	26
Figura 4	A- Matriz de nylon (6x3mm); B- Espécimes confeccionados.....	27
Figura 5	Matriz metálica bipartida (25 x 2 x 2 mm) utilizada para confecção dos espécimes destinados ao teste de resistência flexural.....	27
Figura 6	Corpo-de-prova disposto sobre o <i>stage</i> de posicionamento do micro-Raman, na objetiva de 20X.....	30
Figura 7	A- Resina triturada juntamente com o KBr, disposta dentro do dispositivo para pastilhamento. B- Pastilha confeccionada.....	31
Figura 8	Pastilha posicionada no dispositivo para análise do grau de conversão no espectrômetro.....	31
Figura 9	Células de linhagem fibroblástica 3T3 utilizadas para o teste de citotoxicidade das resinas experimentais.....	33
Figura 10	Formação dos cristais de formazan na cor azul, a partir da quebra do sal tetrazolium.....	34
Figura 11	Espectrofotômetro utilizado para leitura da intensidade da luz azul das células viáveis (atividade mitocondrial).....	34
Figura 12	Tubos contendo as resinas experimentais, 1,8 mL de caldo Sabouraud e 200 µL de suspensão de <i>Candida albicans</i> e <i>Streptococcus mutans</i> , prontos para serem levados à estufa por 72 h para incubação.....	36
Figura 13	Placas de Petri para contagem das UFC/mL de <i>Candida albicans</i> . Linha A: DMAEMA0,2; Linha B: BZN0,2; linha C: DMAEMA 0,5; linha D: DMAEMA 1,2; linha E: BZN0,5. A primeira coluna representa a diluição pura, a segunda representa a diluição decimal a 10^{-1} , e a terceira corresponde à diluição 10^{-2}	37

Figura 14	Placas de Petri para contagem das UFC/mL de <i>Streptococcus mutans</i> . A: Grupo DMAEMA0,2; B: Grupo DMAEMA0,5; C: Grupo DMAEMA1,2; D: Grupo BZN0,2; E: Grupo BZN0,5.....	38
Figura 15	Aparelho de refletância total atenuada (ATR) acoplado ao espectrômetro FT-IR.....	40
Gráfico 1	Viabilidade celular das células fibroblásticas 3T3 frente a cada grupo experimental.....	99
Quadro 1	Composição das resinas compostas experimentais.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grau de conversão em micro-Raman (em %) de cada grupo experimental.....	97
Tabela2	Grau de conversão em FT-IR (em %) de cada grupo experimental.....	97
Tabela 3	Microdureza superficial (VHN) de cada grupo experimental.....	97
Tabela 4	Resistência flexural (em MPa) de cada grupo experimental.....	97
Tabela 5	Resistência à compressão (em MPa) de cada grupo experimental.....	97
Tabela 6	Módulo de elasticidade (em GPa) de cada grupo experimental.....	98
Tabela 7	Aderência <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> (UFC/mL) em cada grupo experimental.....	98
Tabela 8	Aderência <i>in vitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> (UFC/mL) em cada grupo experimental.....	98
Tabela 9	Citotoxicidade frente às células fibroblásticas 3T3 em cada grupo experimental.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANSI/ADA	American National Standards Institute/American Dental Association (Instituto Americano de Padrões Nacionais/Associação Dental Americana)
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Tests and Methods (Sociedade Americana para Materiais e Testes)
BDO	benzodioxole
BHI	Brain and Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)
BHT	hidroxitolueno butilado
Bis-GMA	Bisfenol A-Glicidil Metacrilato
BZN	4,4'-bisdimetilamino benzidrol
cm	centímetro
cm ⁻¹	centímetro a menos um
CQ	canforoquinona
DC	degree of conversion (grau de conversão)
DMAEMA	dimetilaminoetil metacrilato
DMMO	4-dimetil-aminobenzil metacrilato
DMOH	N,N - dimetilaminobenzil álcool
DMPDA	N,N-dimetil-N 'N'-di[2-(metilacrilóil)ethoxycarboniletil] propildiamina
DMT	dimetil para-toluidina
EDMAB	etil 4-dimetilaminobenzoato
EGDPM	3-dietilamino-propionato metacrilato
FT-IR	Fourier-transformed Infrared (Infravermelho por Transformada de Fourier)
GC	grau de conversão
h	hora
ISO	International Organization for Standardization (Organização Internacional para Padronização)
KHN	Dureza Knoop
KN	quilo-Newton
KP	kinetics of polymerization (cinética de polimerização)
kV	quilovoltagem
LED	light emitting diode (diodo emissor de luz)
MDBMA	metilenodioxibenzeno metoxilacetato
MDBMM	metilenodioxibenzeno
MDP	maximum degree of polymerization (máximo grau de polimerização)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	mililitro
mm	milímetro
mm/min	milímetro por minuto
MPa	mega-Pascal
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolium bromido
mW	miliwatts
mW/cm ²	miliwatts por centímetro quadrado
N	Newton
NDMH	N`-dimetil-N`di[metacrilóxietyl] 1,6-hexanediamina

nm	nanometro
PA	piperonil-alcool benzodioxole
PPD	fenilpropanediona
p	valor de significância
R	razão
Rpm	rotações por minuto
s	segundo
SMA	sesamol metacrilato
TBA	ácido 1,3-dietil-2-tiobarbitúrico
TEGDMA	trietilenoglicol dimetacrilato
TPO	Lucirin-TPO
UFC/mL	unidades formadoras de colônia por mililitro
VHN	Dureza Vickers
vs	versus
μL	microlitro
μm	micrometro
μm/mL	micrometro por mililitro

LISTA DE SÍMBOLOS

X	Aumento da lente óptica
°C	Grau Celsius
=	Igual
>	Maior
<	Menor
™	Trade Mark (Marca Registrada)
nº	Número
%	Porcentagem
®	Registrado
Δ	Delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	PROPOSIÇÃO.....	21
	Proposição geral.....	21
	Proposição específica.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	EXPERIMENTO 1.....	22
3.1.1	Preparo da resina composta experimental.....	22
3.1.2	Grupos de estudo.....	23
3.1.3	Teste da microdureza superficial.....	25
3.1.4	Teste de resistência à compressão.....	26
3.1.5	Teste de resistência flexural e módulo de elasticidade.....	27
3.1.6	Teste de grau de conversão.....	28
3.1.6.1	Micro-Raman.....	28
3.1.6.2	FT-IR com confecção de pastilhas de KBr.....	30
3.1.7	Teste de citotoxicidade.....	32
3.1.8	Avaliação <i>in vitro</i> da aderência de <i>Candida albicans</i> e <i>Streptococcus mutans</i> nas resinas compostas.....	34
3.1.9	Análise estatística.....	38
3.2	EXPERIMENTO 2.....	38
3.2.1	Espectroscopia micro-Raman.....	39
3.2.2	FT-IR com Aparelho de Refletância Total Atenuada (ATR).....	39
3.2.3	FT-IR com confecção de pastilhas de KBr.....	40
3.2.4	Análise Estatística.....	40
4	CAPÍTULOS.....	41
4.1	CAPÍTULO 1.....	42

4.2	CAPÍTULO 2.....	59
4.3	CAPÍTULO 3.....	82
5	DISCUSSÃO.....	100
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
	REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

As resinas compostas disponíveis no mercado, atualmente, são na sua maioria, resinas fotoativadas. Para tanto, moléculas fotoiniciadoras são incluídas nesses materiais, as quais têm a capacidade de absorver luz, e como resultado, gerar radicais livres que iniciam a polimerização desses materiais resinosos (Stansbury¹ 2000).

O sistema fotoiniciador mais comumente utilizado nas resinas compostas é o sistema canforoquinona/amina. A canforoquinona é um fotoiniciador que necessita de um co-iniciador para realizar o processo de polimerização efetivamente. As aminas terciárias (alifáticas ou aromáticas) não absorvem luz, mas interagem com a canforoquinona ativada para produzir espécies reativas (Jakubiak et al.² 2003, Jakubiak et al.³ 2007). Porém, esse sistema fotoiniciador possui algumas desvantagens, como tendência a promover uma coloração amarelada aos materiais resinosos (Schneider et al.⁴ 2008), aumentar a hidrofiliabilidade dos mesmos (Cadenaro et al.⁵ 2010), e causar corrosão dos substratos (Andrzejewska⁶ 2001). Inclusive, aminas aromáticas são suspeitas de possuir baixa biocompatibilidade com os tecidos orais (Liso et al.⁷ 1997, Vázquez et al.⁸ 1997, Achillias, Siderou⁹ 2004), podendo exibir característica mutagênica (Kucybala et al.¹⁰ 1996).

Sabe-se que fatores como tipo de fotoiniciador (Schneider et al.⁴ 2008; Schneider et al.¹¹ 2009, Costa Oliveira et al.¹² 2012), razão entre fotoiniciador/co-iniciador (Schneider et al.¹³ 2009, Musanje et al.¹⁴ 2009), tipo e concentração do co-iniciador (Schroeder et al.¹⁵ 2008, Leprince et al.¹⁶ 2011) podem influenciar as propriedades dos materiais resinosos. Estas propriedades compreendem desde a taxa de polimerização, o grau de conversão, o estresse de contração, a microdureza, como o comprometimento estético e a biocompatibilidade dos materiais.

Para determinados sistemas resinosos, uma maneira de reduzir a toxicidade, aumentar a estabilidade de cor sem comprometer as propriedades físico-mecânicas dos polímeros com canforoquinona/amina é explorar novos substitutos para as aminas já utilizadas no mercado (Shi¹⁷ 2006, Wu¹⁸ 2007, Wang et al.¹⁹ 2009). Essas

moléculas devem apresentar alta reatividade e promover alto grau de conversão do monômero, já que monômeros não reativos podem se difundir para fora da matriz polimérica até a saliva na cavidade oral (Shi¹⁷ 2006).

Dentre os co-iniciadores pesquisados, uma amina terciária, desenvolvida por Vázquez et al.⁸ (1997) (DMOH - N,N-dimetilaminobenzil álcool) para utilização em cimentos ósseos, foi avaliada por Schroeder et al.¹⁵ (2008) com a proposta de ser um co-iniciador alternativo aos materiais resinosos à base de Bis-GMA e TEGDMA. Os autores encontraram resultados satisfatórios com o co-iniciador em questão, com o qual obtiveram alto grau de conversão da canforoquinona em concentrações menores de 0,25%. Nesse estudo, a efetividade do conjunto canforoquinona/DMOH, em termos de formação de radicais e conversão final dos monômeros foi maior que de canforoquinona/ DMAEMA (dimetilaminometil-metacrilato - co-iniciador comumente utilizado nos compósitos).

O co-iniciador 4,4'-bisdimetilaminobenzidrol (BZN) foi estudado por de la Torre et al.²⁰ (2003) e de la Torre et al.²¹ (2007), para ser utilizado como amina substituta em cimentos ósseos. Esses compostos apresentavam ótimo desempenho quanto à biocompatibilidade, como baixa citotoxicidade e características antissépticas e antibacterianas frente ao tecido ósseo e conjuntivo de ratos. Porém, nenhum estudo utilizou o co-iniciador em resinas fotoativadas para uso dental, motivo de interesse do presente estudo.

Desta forma, mais estudos são necessários para se verificar o desempenho desse co-iniciador na formulação das resinas compostas, principalmente no tocante às propriedades mecânicas e biológicas das mesmas.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Proposição geral

Avaliar o efeito do co-iniciador 4,4`bis-dimetilaminobenzidrol no grau de conversão e nas propriedades mecânicas e biológicas das resinas compostas experimentais.

2.2 Proposição específica

1- Avaliar o efeito do co-iniciador BZN, em diferentes concentrações, na microdureza superficial, resistência à compressão, resistência flexural, módulo de elasticidade, grau de conversão, citotoxicidade e atividade antimicrobiana de resinas compostas experimentais.

2- Avaliar o efeito do co-iniciador DMAEMA comumente utilizado na formulação das resinas compostas (controle), na microdureza superficial, resistência à compressão, resistência flexural, módulo de elasticidade, grau de conversão, citotoxicidade e atividade antimicrobiana de resinas compostas experimentais.

3- Avaliar e correlacionar três métodos de mensuração do grau de conversão (micro-Raman, FT-IR ATR e FT-IR com confecção de pastilha de KBr) de resinas compostas manipuladas com o co-iniciador DMAEMA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO 1

3.1.1 Preparo da resina composta experimental

A resina composta experimental seguiu a formulação a seguir: a matriz orgânica (35% em peso) foi composta de monômeros Bis-GMA (bisfenol A glicidil dimetacrilato) e TEGDMA (trietilenoglicol dimetacrilato). O agente iniciador utilizado foi a canforoquinona (CQ), e o inibidor hidroxitolueno butilado (BHT). Os co-iniciadores utilizados foram dimetilaminoetil-metacrilato (DMAEMA) e 4,4`bis-dimetilaminobenzidrol (BZN), objeto de estudo do trabalho. A fórmula do BZN pode ser visualizada na Figura 1. A matriz inorgânica foi composta de vidro de borossilicato de bário silanizado (tamanho médio de partícula: 0,7 µm – 65% em peso). Todos os compostos, com exceção do BZN, foram usados como recebidos pelos fabricantes. O BZN sofreu um processo de purificação. Misturou-se 10 g do BZN com 10 mL de acetona em um *becker*, e esse conjunto foi filtrado. Logo após, foi realizada a precipitação do composto, juntando-se 200 mL de água gelada com NaOH. Essa mistura foi levada em banho-maria para captação do BZN purificado.

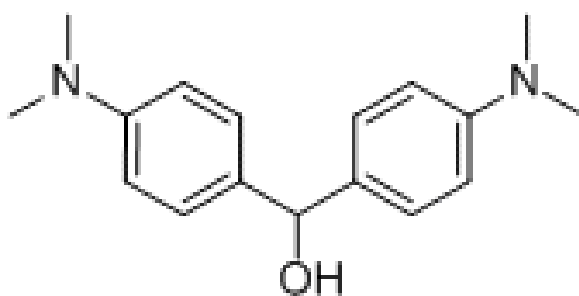


Figura 1 – Fórmula molecular do composto estudado 4,4`bis-dimetilaminobenzidrol (BZN).

A razão molar entre CQ/DMAEMA e CQ/BZN foi mantida constante em 1:1, variando-se as concentrações dos grupos experimentais. Os compósitos experimentais foram preparados em temperatura ambiente sobre pouca iluminação, primeiro preparando-se separadamente a fase orgânica e a inorgânica, e posterior mistura de ambas as fases. Esta mistura foi homogeneizada em misturador de alta

potência (DAC 150.1 FVZ, SpeedMixer, FlackTek, Landrum, SC, EUA) a 2400 rotações por minuto (rpm) por 1 min (Figura 2). Em todas as metodologias a seguir, a distância da ponta do fotopolimerizador (Radii Plus, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália), foi a mesma, para garantir mesma intensidade e densidade de energia incidindo sobre os espécimes ($1000\text{-}1200\text{mW/cm}^2$ e $20\text{-}24\text{ J/cm}^2$, respectivamente). A intensidade de luz do fotopolimerizador foi aferida em radiômetro (SDI, Bayswater, Austrália), antes de cada metodologia.



Figura 2 – Homogeneizadora de alta potência para mistura dos compósitos.

3.1.2 Grupos de estudo

O BZN purificado foi utilizado em 3 diferentes concentrações, assim como o co-iniciador DMAEMA. Apenas o sistema fotoiniciador das resinas compostas experimentais foi modificado, de acordo com os grupos de estudo abaixo:

DMAEMA0,2 – resina composta experimental/sistema fotoiniciador CQ/DMAEMA (0,2/0,2%);

DMAEMA0,5 – resina composta experimental/sistema fotoiniciador CQ/DMAEMA (0,5/0,5%);

DMAEMA1,2 – resina composta experimental/sistema fotoiniciador CQ/DMAEMA (1,2/1,2%);

BZN0,2 – resina composta experimental/sistema fotoiniciador CQ/BZN (0,2/0,2%);

BZN0,5 – resina composta experimental/sistema fotoiniciador CQ/BZN (0,5/0,5%);

BZN1,2 – resina composta experimental/sistema fotoiniciador CQ/BZN (1,2/1,2%).

A composição de cada resina experimental pode ser visualizada no Quadro 1. A concentração inicial de CQ em DMAEMA0,2 (controle) e BZN0,2 é de 0,2%, encontrada na literatura por apresentar reações rápidas e alta conversão dos monômeros (Schroeder et al. 2008), além de apresentar resultados físico-mecânicos satisfatórios num estudo piloto prévio realizado pelos autores.

Quadro 1 – Composição das resinas compostas experimentais*

Resinas compostas	Matriz Orgânica (35% em peso)		Matriz Inorgânica (65% em peso)
	Monômeros	Sistema fotoiniciador	
DMAEMA0,2	Bis-GMA (22,75%), TEGDMA (11,76%), BHT (0,1%)	CQ/DMAEMA 0,2/0,19%	Vidro de borossilicato de bário silanizado
DMAEMA0,5	Bis-GMA (22,75%), TEGDMA (11,17%), BHT (0,1%)	CQ/DMAEMA 0,5/0,48%	
DMAEMA1,2	Bis-GMA (22,75%), TEGDMA (9,81%),	CQ/DMAEMA 1,2/1,14%	

	BHT (0,1%)		
BZN0,2	Bis-GMA (22,75%), TEGDMA (11,62%), BHT (0,1%)	CQ/BZN 0,2/0,33%	
BZN0,5	Bis-GMA (22,75%), TEGDMA (10,83%), BHT (0,1%)	CQ/BZN0,5/0,82%	
BZN1,2	Bis-GMA (22,75%), TEGDMA (8,99%), BHT (0,1%)	CQ/BZN1,2/1,96%	

**legenda: DMAEMA: dimetilaminoetil-metacrilato; BZN: 4,4'- bisdimetilaminobenzidrol; Bis-GMA: bisfenol glicidil metacrilato; TEGDMA: trietilenoglicol dimetacrilato; BHT: hidroxibutiltolueno; CQ: canforoquinona.*

3.1.3 Teste de microdureza superficial

Foram confeccionados 48 espécimes, sendo n=8 para cada grupo. As resinas compostas foram inseridas em matrizes metálicas circulares, contendo uma cavidade de 5 mm de diâmetro por 2 mm de espessura. Essas matrizes foram dispostas sobre uma tira de poliéster e uma placa de vidro. Toda a cavidade da matriz foi preenchida em incremento único, com auxílio de uma espátula. Após a inserção do material, uma nova tira de poliéster foi disposta sobre os espécimes, e com leve pressão, uma placa de vidro foi posicionada acima do conjunto matriz/resina/tira de poliéster, para que houvesse o extravasamento do material resinoso em excesso. A placa de vidro foi retirada e o espécime foi fotoativado por 20 s (Figura 3). Após a polimerização, os espécimes foram armazenados em um recipiente à prova de luz e imersos em água destilada a 37°C por 24 horas, para aguardar a realização do teste de microdureza superficial.



Figura 3 – Matrizes metálicas preenchidas por resina composta.

O teste de microdureza Vickers (VHN) foi realizado em microdurômetro (Shimadzu, Kyoto, Japão). A superfície do espécime foi dividida em 4 quadrantes, onde foram realizadas 5 indentações com uma carga de 50g por 15 s cada.

3.1.4 Teste de resistência à compressão

Foram utilizadas matrizes de nylon (6x3 mm) (Figura 4A) para confecção de cilindros de resina composta (Figura 4B), os quais foram levados a uma máquina de ensaios universal (Autograph AG-I, Shimadzu, Toquio, Japão) para serem submetidos ao teste de compressão. Esses espécimes foram fabricados da mesma forma como descrito para o teste de microdureza, e $n=5$ por condição experimental. A fotopolimerização com LED (Radii-Plus) foi realizada por 20 s em cada extremo dos espécimes, para garantir uma adequada dose de energia por todo o corpo do espécime. Os mesmos foram armazenados em um recipiente à prova de luz e imersos em água destilada a 37°C por 24 h. A carga utilizada foi de 10 KN numa velocidade de 1 mm/min, sobre angulação de 90°, até a falha do espécime, de acordo com a ISO 4049 (Adendo) e ANSI/ADA (specification n. 27 for direct filling resins)²². Foi obtida a tensão de ruptura da resina composta à compressão em MPa.

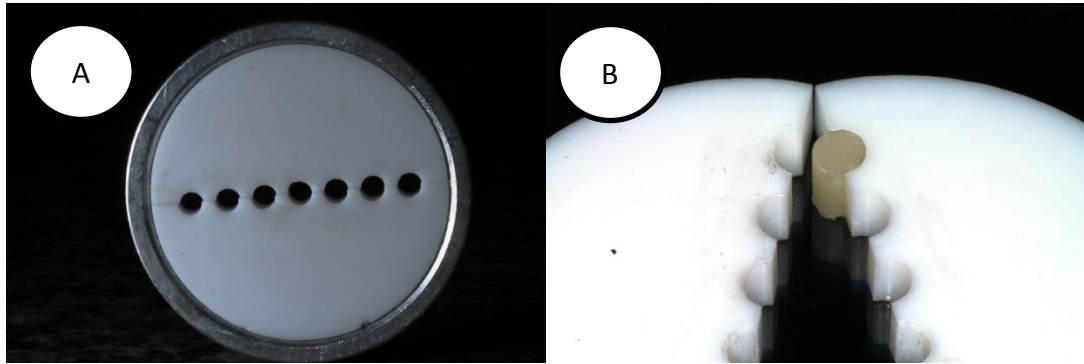


Figura 4- A- Matriz de nylon (6x3 mm). B- Espécime confeccionado.

3.1.5 Teste de resistência flexural e módulo de elasticidade

Para realização desse teste, os espécimes foram confeccionados de acordo com as normas da ISO 4049 e ANSI/ADA n. 27²². O teste escolhido foi o de 3 pontos, e $n=5$ para cada condição experimental. Foram confeccionados espécimes retangulares, em matriz metálica bipartida de 25 X 2 X 2 mm (Figura 5). A fotopolimerização foi realizada por três vezes (20 s cada), para garantir adequada fotopolimerização do conjunto. Cada porção já polimerizada era coberta com uma tira de alumínio para evitar polimerização adicional²². A dimensão dos espécimes foi avaliada em paquímetro digital (Mitutoyo Corp., Tóquio, Japão), e então armazenados em água destilada a 37°C por 24 h, para realização do teste.



Figura 5- Matriz metálica bipartida (25 X 2 X 2 mm) utilizada para confecção dos espécimes destinados ao teste de resistência flexural.

Os espécimes foram dispostos horizontalmente sobre os suportes de flexão da máquina de ensaios universal (Autograph AG-I, Shimadzu, Toquio, Japão). A porção móvel da máquina incidiu sob o braço fixo, atingindo perpendicularmente os espécimes em suas regiões centrais, até ocorrer a fratura. O teste foi realizado numa velocidade de 0,5 mm/min. A carga máxima de fratura (em N) de cada espécime, foi mensurada, e a resistência flexural (RF) calculada em MPa, de acordo com a equação:

$$RF = 3FL/2bh^2$$

onde:

F: máxima carga exercida sobre o espécime, em N;

L: distância entre os suportes;

b: espessura do espécime;

h: altura do espécime.

Neste teste, foi possível verificar o módulo de elasticidade flexural das resinas compostas, expresso em GPa, de acordo com a equação:

$$ME = L^3 \Delta P / 4bh^3 \Delta d$$

onde:

L: distância entre os suportes;

h: altura do espécime;

b: espessura do espécime;

ΔP : Força máxima exercida no espécime;

Δd : deflexão máxima exercida no espécime.

3.1.6 Teste de grau de conversão

3.1.6.1 micro-Raman

A espectroscopia Raman (modelo SENTERRA, Brucker Optics, Ettlingen, Alemanha) foi utilizada para avaliação do grau de conversão das resinas compostas experimentais. Realizaram-se duas mensurações das resinas compostas: fotopolimerizadas e não-fotopolimerizadas. Tomou-se o cuidado de se realizar as leituras em 24 h após a confecção dos espécimes, para que não houvesse diferença de tempo decorrido da polimerização entre os testes. O dispositivo consiste de um

microscópio ótico e um *stage* de posicionamento micronizado, em que um feixe de laser verde de 532 nm é aplicado sobre a amostra, o qual retorna pelo mesmo caminho ótico, e apenas 1 em 10^8 dos fótons emitidos sofre desvio, e conseqüente espalhamento inelástico. Esse espalhamento é então detectado em um sensor tipo CCD a -65°C , e o espectro Raman de interesse obtido pela relação entre a intensidade obtida para cada pico e o comprimento de onda do pico, em cm^{-1} . Cada espécime foi posicionado sobre o *stage*, no foco da objetiva (aumento de 20X) (Figura 6). Um sistema de imagem acoplado ao aparelho permitiu verificar o correto posicionamento do laser. Foram realizadas 5 leituras (*co-additions*) por espécime, com tempo de integração de 40 s cada. A abertura confocal do laser (*spot*) foi 25 μm , sob potência de 20 mW. A região espectral de interesse foi $1785\text{--}875\text{ cm}^{-1}$, e foram obtidos espectros a uma resolução de 4 cm^{-1} . Três mensurações foram realizadas em cada espécime, e uma média aritmética foi obtida para cada amostra ($n=5$). Para investigar as diferenças no grau de conversão de cada grupo, os espectros obtidos para análise foram: o pico $1,637\text{ cm}^{-1}$ (indica as duplas ligações de carbono alifáticas) e o pico $1,608\text{ cm}^{-1}$ (indica as duplas ligações de carbono aromáticas das moléculas de Bis-GMA). Após realizar-se a integração dos picos, para delimitação das áreas de cada um deles, obteve-se a razão das áreas encontradas em cada pico, tanto para a resina polimerizada como não polimerizada, de acordo com a equação: $R_{\text{polímero}} = \text{Área } 1,637\text{ cm}^{-1} / \text{Área } 1,608\text{ cm}^{-1}$ da resina composta polimerizada, e $R_{\text{monômero}} = \text{Área } 1,637\text{ cm}^{-1} / \text{Área } 1,608\text{ cm}^{-1}$ da resina composta antes da polimerização. O grau de conversão (GC) da resina composta foi então calculado:

$$\text{GC} = 1 - R_{\text{polímero}} / R_{\text{monômero}} \times 100$$



Figura 6- Corpo-de-prova disposto sobre o *stage* de posicionamento do micro-Raman, na objetiva de 20X.

3.1.6.2 FT-IR com confecção de pastilhas de KBr

Para esta metodologia, 6 espécimes foram confeccionados para cada grupo, da mesma forma como para o teste de microdureza (5 x 2 mm). Após 24 horas da confecção dos espécimes pulverizou-se o centro dos mesmos, no sentido topo-base, os quais foram mantidos na penumbra até o momento da análise em FT-IR (IR Prestige-21, Shimadzu, Tóquio, Japão). Apenas 1 mg do pó do espécime foi misturado com 100 mg de pó de sal de brometo de potássio (KBr). Essa mistura foi disposta dentro de um dispositivo para pastilhamento (Figura 7A), e então esse conjunto foi comprimido numa prensa hidráulica (modelo SSP-10A, Shimadzu, Tóquio, Japão), com carga de 80 KN durante 3 min. Obtida a pastilha (Figura 7B), a mesma foi posicionada dentro do suporte fixo do espectrômetro, acoplado no suporte para leitura (Figura 8). Também se realizou a análise das amostras não polimerizadas para o cálculo de grau de conversão. Os espectros de absorbância da resina polimerizada e não polimerizada foram analisados na região de 400 a 4000 cm^{-1} operando sobre as seguintes especificações: 64 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} . O grau de conversão foi calculado da mesma forma como para os testes descritos anteriormente.

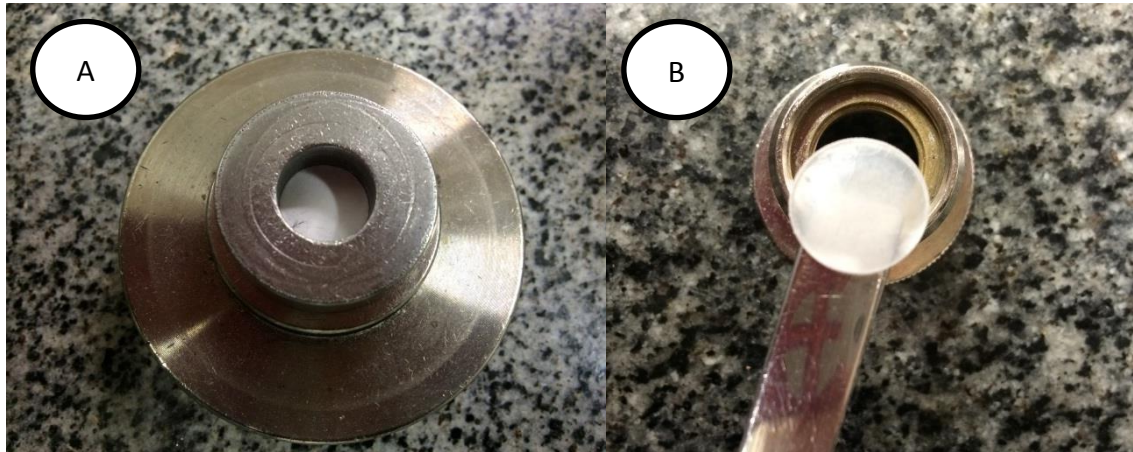


Figura 7 – A- Resina triturada juntamente com o KBr, disposta dentro do dispositivo para pastilhamento. B- Pastilha confeccionada.

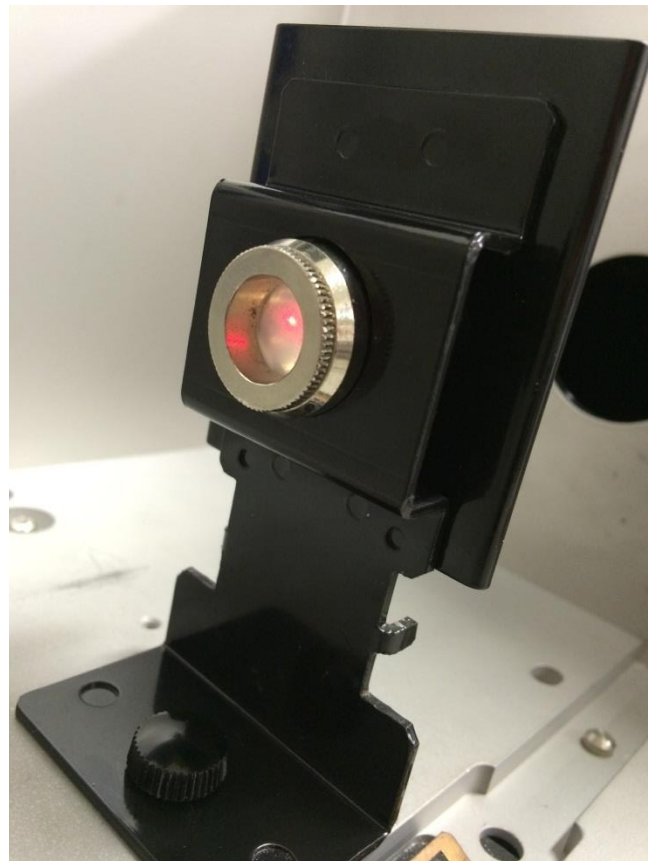


Figura 8 – Pastilha posicionada no dispositivo para análise do grau de conversão no espectrômetro.

3.1.7 Teste de citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade das resinas compostas experimentais, seguiu-se o protocolo ISO 10993-5 (Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing)²³. Foram confeccionados espécimes de todos os grupos, assim como realizado para os testes de microdureza, sendo $n=4$ para cada grupo experimental. O teste foi realizado em triplicata, e a média dos testes foi utilizada para fins estatísticos. Os espécimes de resina composta foram mantidos 24 h em água destilada estéril em estufa de CO_2 a 37°C . Decorrido esse período, os mesmos foram limpos em cuba ultrassônica por 30 minutos, seguindo a esterilização do espécime através da luz ultravioleta por 15 minutos cada lado, dentro do fluxo laminar. Em seguida foram colocados em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio DMEN (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), com 100 IU/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina, mantidas em estufa de CO_2 a 37°C por 24 h. Decorrido esse período, 200 μL de cada extrato formado foi transferido em quadruplicata para placa de 96 poços já aderida 24 h com células fibroblásticas 3T3 1×10^5 céls/poço (Figura 9), para avaliação citotóxica. Para controle positivo, utilizou-se poço apenas com meio suplementado com SFB a 10 % (Campanha et al.²⁴ 2006, Jorge et al.²⁵ 2004, Jorge et al.²⁶ 2006, Jorge et al.²⁷ 2007).

O cultivo dessas células foi realizado em frascos para cultura de células, incubados em estufa com 5% de CO_2 à temperatura de 37°C com umidade controlada (Campanha et al.²⁴ 2006, Jorge et al.²⁵ 2004, Jorge et al.²⁶ 2006, Jorge et al.²⁷ 2007). Para realização dos testes, uma suspensão de 1×10^5 células/poço de meio de cultura foi preparado. Para tanto, as células foram descoladas do fundo dos frascos por meio de um raspador de células. Essa suspensão foi disposta em tubos de 15 mL e centrifugada por 10 min a 1200 rpm, a fim de ocorrer a precipitação das células no fundo do tubo, formando o *pellet*. Desprezou-se o sobrenadante e 1 mL de meio foi suplementado para a contagem. Foram retirados 10 μL e misturados com 10 μL de corante azul de Tripán. Dessa solução, 10 μL foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburgo, Alemanha) onde as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio ótico (Nikon – modelo YS 100, Tóquio, Japão) num aumento de 400X.

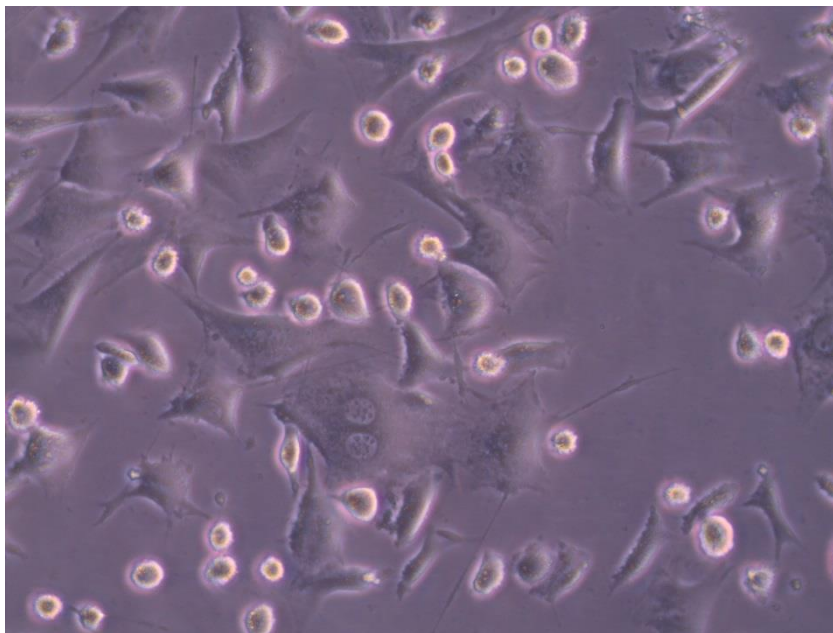


Figura 9- Células de linhagem fibroblástica 3T3 utilizadas para o teste de citotoxicidade das resinas experimentais.

Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de 1×10^5 células/poço para utilização no teste de citotoxicidade. Essa citotoxicidade foi analisada quantitativamente por meio da análise colorimétrica MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazoliumbromido). Nesta técnica, avaliou-se a atividade mitocondrial das células: o sal metiltetrazolium se incorpora à cultura de células; a enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal tetrazolium, produzindo cristais de formazan cor azul violeta (Figura 10); determinam-se assim valores relativos à intensidade da cor azul em espectrofotômetro específico com comprimento de onda de 570 nm (Leitor de Elisa Biotek EL 800, Biotek, Winooski, VT, EUA) (Figura 11). Estabelece a relação de quanto maior a atividade mitocondrial, maior a intensidade da luz azul, e por sua vez, maior o número de células viáveis (Campanha et al.²⁴ 2006, Jorge et al.²⁵ 2004, Jorge et al.²⁶ 2006, Jorge et al.²⁷ 2007).

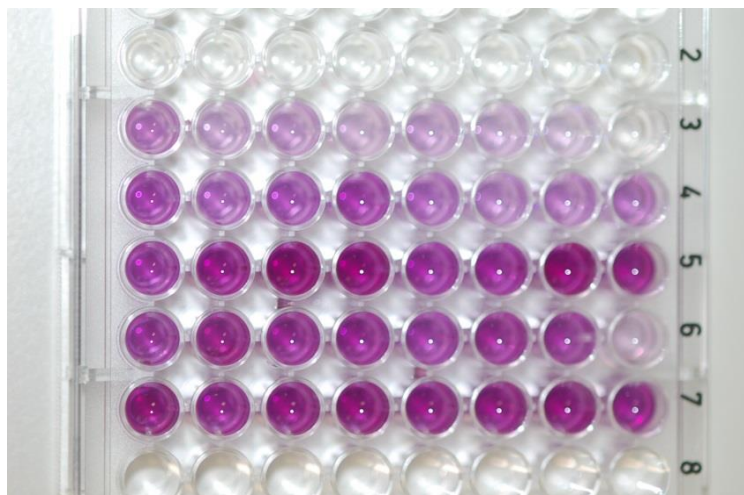


Figura 10- Formação dos cristais de formazan na cor azul violeta, a partir da quebra do sal tetrazolium.



Figura 11- Espectrofotômetro – leitor de placas ELISA - utilizado para leitura da intensidade da luz azul das células viáveis (atividade mitocondrial).

3.1.8 Avaliação *in vitro* da aderência de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* sobre as resinas compostas

Para esta avaliação, analisou-se a aderência de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* sobre a resina experimental. Primeiramente, preparou-se caldo Sabouraud e BHI (Infusão de Cérebro e Coração) e 1,8 mL do caldo foram dispostos em tubos de ensaio a 36° C por 24 h, para verificação da esterilidade do meio. Foram preparadas placas de Agar Sabouraud para semeadura de *Candida*

albicans (ATCC 10231) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), para confirmação da pureza. Os corpos-de-prova foram confeccionados da mesma forma como para microdureza superficial (n=5). Após 24 h, realizou-se a desinfecção dos espécimes com álcool e luz ultravioleta, seguindo um protocolo previamente descrito na literatura (Wang et al.²⁸ 2014): 10 s imersos em álcool, 1 min de limpeza em gaze com álcool, novamente 10 s de imersão em álcool, e por fim, 2 h de esterilização em câmara de fluxo laminar (1 h para cada lado). Os espécimes foram colocados dentro de tubos com 1,8 mL de caldo Sabouraud (para *Candida albicans*) e BHI (para *Streptococcus mutans*) incubados por 24 h para verificar a esterilidade dos mesmos.

Procedeu-se o preparo de 10 mL da suspensão de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* (0,5 da escala McFarland – 1×10^8 células/mL, verificado em espectrofotômetro – 580 nm). Em cada tubo, já com os espécimes e os meios, foram pipetados 200 µL das suspensões previamente calibradas, totalizando 2 mL em cada tubo. Esse conjunto ficou incubado por 72 h a 36°C (Figura 12). Decorrido esse período, os corpos-de-prova foram removidos dos tubos e lavados em solução salina por 20 s, para serem transferidos a tubos esterilizados onde adicionou-se 1 mL de solução salina. Agitou-se vigorosamente o tubo em Vortex por 1 min, para desprendimento das células aderidas. Esta foi considerada a solução pura, e a partir dela foram feitas diluições seriadas até 10^{-2} para *Candida albicans* e 10^{-1} para *Streptococcus mutans*. Dessas diluições, 100 µL foram semeados em placas com agar Sabouraud e BHI, em duplicata para serem incubados por 48 h e 72 h para *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, respectivamente, a 36°C. As placas semeadas com *Candida albicans* em agar Sabouraud permaneceram em aerobiose, e as placas semeadas com *Streptococcus mutans* em agar BHI, em microaerofilia. Após esse período, as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foram contadas para verificação da aderência de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, em cada corpo-de-prova (Figuras 13 e 14, respectivamente).

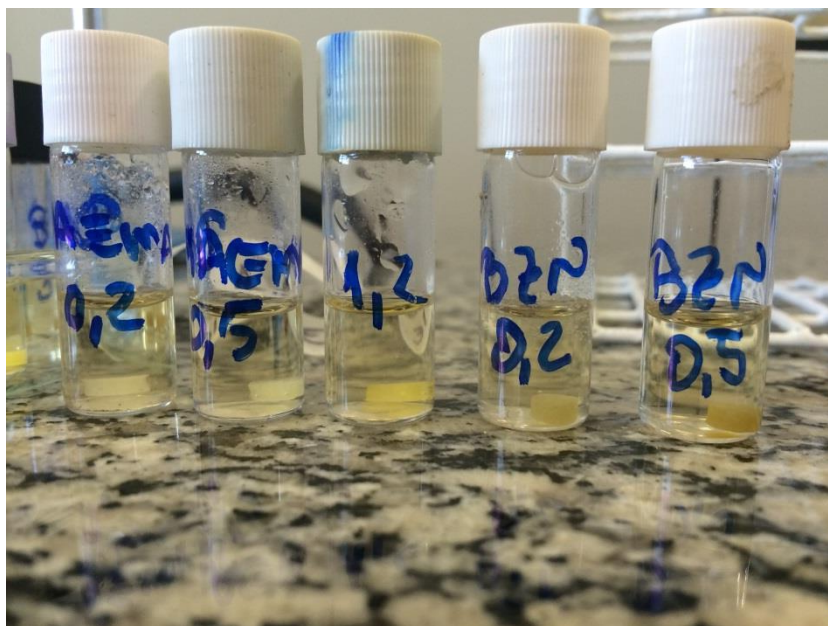


Figura 12 – Tubos contendo as resinas experimentais, 1,8 mL de caldo Sabouraud e 200 μ L de suspensão de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, prontos para serem levados à estufa por 72 h para incubação.

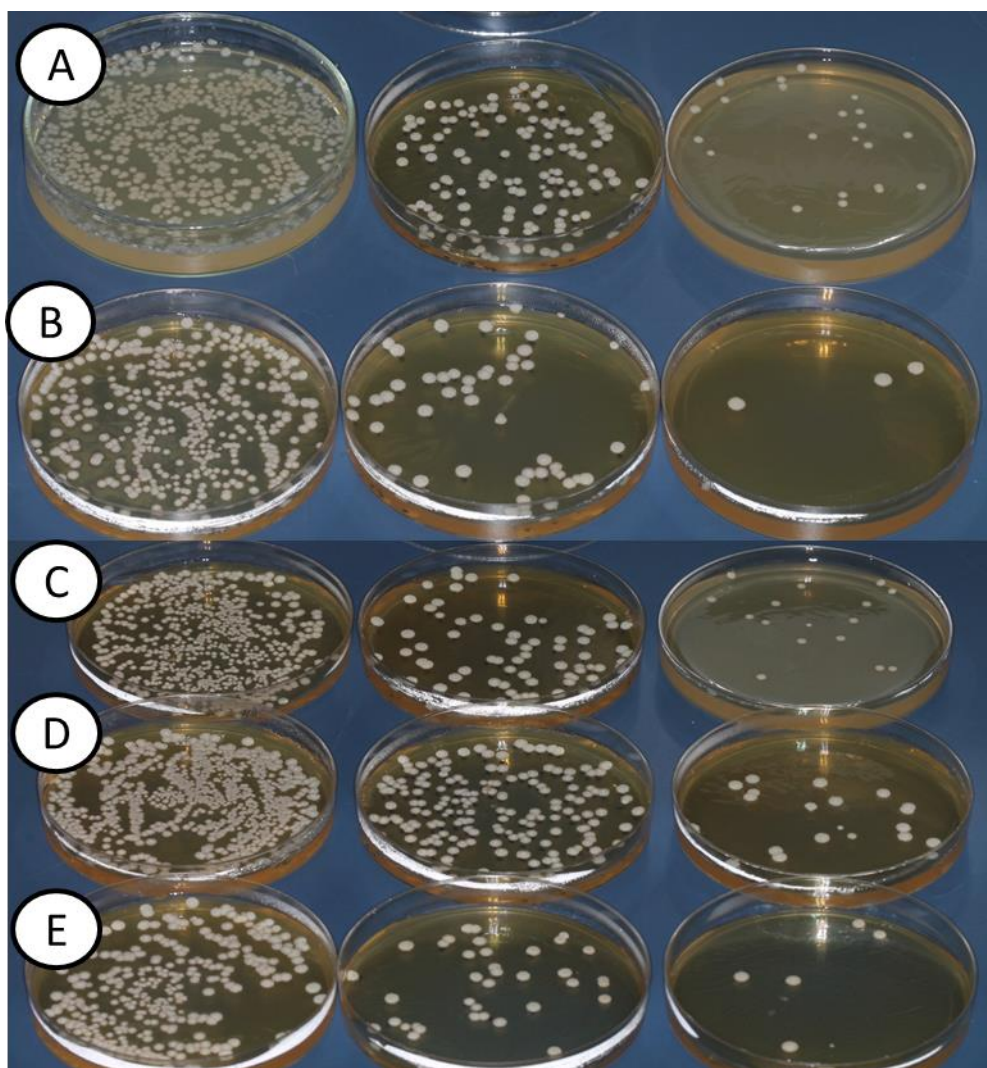


Figura 13 – Placas de Petri para contagem das UFC/mL de *Candida albicans*. Linha A: DMAEMA 0,2; linha B: BZN 0,2; linha C: DMAEMA 0,5; linha D: DMAEMA 1,2; linha E: BZN 0,5. A primeira coluna representa a suspensão pura, a segunda representa a diluição decimal a 10^{-1} , e a terceira corresponde à diluição 10^{-2} .

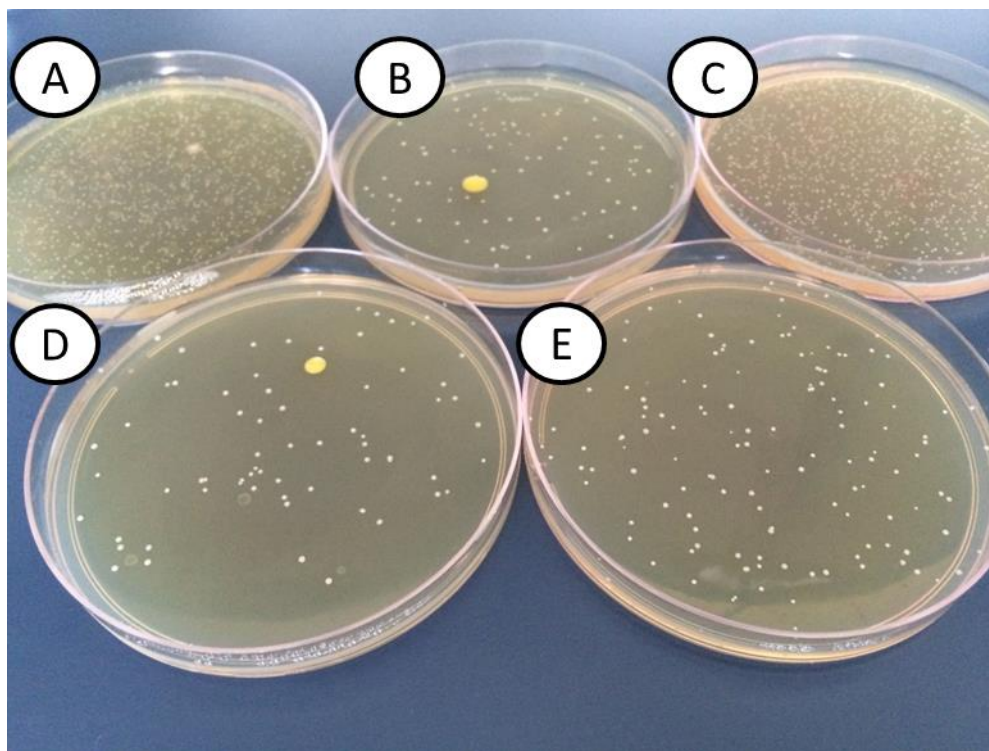


Figura 14 – Placas de Petri para contagem das UFC/mL de *Streptococcus mutans*.

A: Grupo DMAEMA0,2; B: Grupo DMAEMA0,5; C: Grupo DMAEMA1,2;
D: Grupo BZN0,2; E: Grupo BZN0,5.

3.1.9 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada por ANOVA 1 fator e pós-teste de Tukey, com $\alpha=0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

3.2 EXPERIMENTO 2

Para o Experimento 2, foi realizada a comparação de 3 métodos para análise do grau de conversão de resinas compostas. Para tanto, utilizou-se as 3 resinas controles manipuladas no Experimento 1:

DMAEMA0,2 – resina composta experimental/sistema fotoiniciador CQ/DMAEMA (0,20/0,20%);

DMAEMA0,5 – resina composta experimental/sistema fotoiniciador CQ/DMAEMA (0,5/0,5%);

DMAEMA_{1,2} – resina composta experimental/sistema fotoiniciador CQ/DMAEMA (1,2/1,2%).

3.2.1 Espectroscopia micro-Raman

O primeiro teste de grau de conversão em micro-Raman seguiu os mesmos padrões já citados no Experimento 1, assim como a confecção dos espécimes (n=6). As especificações foram: ajuste do microscópio em 20X, abertura confocal de 25 μm , tempo de acumulação de 30 s e 5 leituras (*co-additions*). Foram feitas 3 mensurações por espécime, e a média aritmética dessas medidas foi considerada para fins estatísticos.

3.2.2 FT-IR com Aparelho de Refletância Total Atenuada (ATR)

Novos espécimes (n=6) foram confeccionados para realização do teste de grau de conversão em FT-IR (IR Prestige-21). O espectrômetro foi acoplado a um aparelho de refletância total atenuada (DRS-8000, Shimadzu, Tóquio, Japão) (Figura 15) que consiste de um cristal de diamante de 2 mm de diâmetro. Os espectros de absorbância foram obtidos na região de interesse entre 400 a 4000 cm^{-1} . Seis medidas foram realizadas, numa resolução de 4 cm^{-1} e 64 *scans*. Os mesmos picos (1608 e 1637 cm^{-1}) e equação usados no Experimento 1 foram utilizados para o cálculo de grau de conversão neste teste. Da mesma forma como para micro-Raman, foram feitas três mensurações por espécime, e obtida a média aritmética de cada um para fins estatísticos.

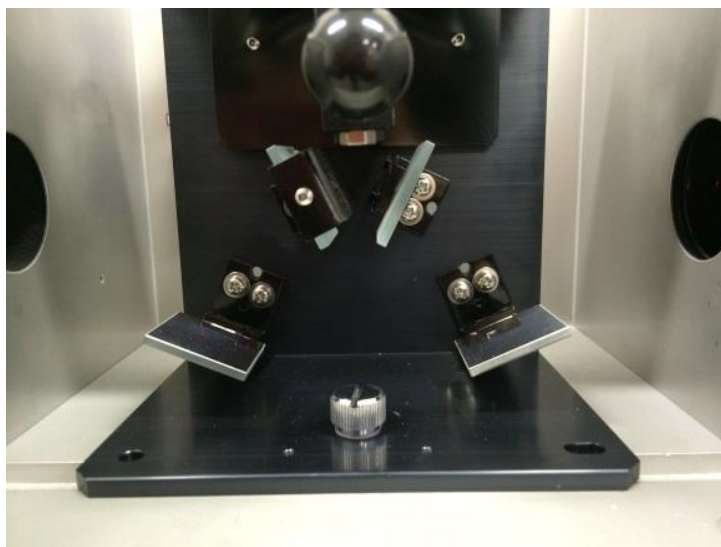


Figura 15 – Aparelho de refletância total atenuada (ATR) acoplado ao espectrômetro FT-IR.

3.2.3 FT-IR com confecção de pastilhas de KBr

Para esta metodologia, 6 espécimes foram confeccionados para os 3 grupos. Nas mesmas condições supracitadas no teste do Experimento 1. Os espectros de absorvância da resina polimerizada e não polimerizada foram analisados na região de 400 a 4000 cm^{-1} operando sobre as seguintes especificações: 64 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} . O grau de conversão foi calculado da mesma forma como para os testes descritos anteriormente.

3.2.4 Análise Estatística

As médias de cada grupo foram analisadas por ANOVA 2 fatores (teste versus concentração da resina experimental) e pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

A correlação entre as três metodologias foi analisada por regressão linear múltipla. A significância da regressão e das variáveis independentes foi estimada por teste F e *t*, respectivamente, com 95% de confiança.

4 CAPÍTULOS

4.1 Artigo publicado na Revista Oral Health and Dental Management: *Bittencourt BF, Dominguez JA, Farago PV, Pinheiro LA, Gomes OMM. Alternative Coinitiators Applicable to Photocurable Resin Composites. Oral Health Dent Manag. 2014; 13(3):568-72.*

4.2 Artigo em revisão na Revista Dental Materials, intitulado: *Correlation between degree of conversion measurements of resin-based dental materials: comparison of micro-Raman spectroscopy and FT-IR analyzes.*

4.3 Redação da patente referente à resina composta com BZN, autorizada para depósito pelo Conselho Administrativo de Número 432/2014.

4.1 Artigo publicado na Revista Oral Health and Dental Management. *Bittencourt BF, Dominguez JA, Farago PV, Pinheiro LA, Gomes OMM. Alternative Coinitiators Applicable to Photocurable Resin Composites. Oral Health Dent Manag. 2014; 13(3):568-72.*

Fwd: Your Submission has been accepted for publication



john alexis dominguez 12:33 ▶

Para: Bruna Bittencourt ✉

----- Mensagem encaminhada -----

De: "Oral Health" <no-reply@editorialmanager.com>

Data: 22/05/2014 03:27

Assunto: Your Submission has been accepted for publication

Para: "John Alexis Dominguez" <johnalexis.dominguez@gmail.com>

Cc:

Ref.: Ms. No. Oral Health-14-143

Alternative Coinitiators Applicable to Photocurable Resin Composites

Oral Health and Dental Management

Dear Dr. Dominguez,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Oral Health and Dental Management.

It was accepted on May 19, 2014.

Thank you for submitting your work to this journal.

Best regards,

Editor

Oral Health and Dental Management

Alternative Coinitiators Applicable to Photocurable Resin Composites

Bruma Fortes Bittencourt¹, John Alexis Dominguez¹, Paulo Vitor Farago², Luis Antonio Pinheiro³, Osnara Maria Mongruel Gomes¹

¹Department of Dentistry, State Ponta Grossa University, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. ²Department of Pharmaceutical Sciences, State Ponta Grossa University, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, Paraná, Brazil. ³Department of Materials Engineering, State Ponta Grossa University, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, Paraná, Brazil.

Abstract

This review aimed to examine the evolution of the composite resins' photoinitiator system, with emphasis on those developed in recent years. This review covered literature from 1990 to 2013 and only papers with the key words of interest were included: "coinitiators", "amines", "composite resins", "photopolymerization". The search used full-text papers from PubMed and Science Direct databases. It was included only English papers, and meeting abstracts and short communications were excluded. Hand search of the references completed the review. A total of 29 articles were studied. Many coinitiators are being researched as an alternative to traditional tertiary amines, particularly in order to improve the physical and mechanical properties of the final polymer and its biocompatibility with oral tissues. Polymerizable amines, natural compounds, and coinitiators with low toxicity and antiseptic properties were studied, and the results found they would be promising substitutes. These materials must present appropriate concentration and reactivity to obtain adequate physical and mechanical properties and high biocompatibility. However, further *in vivo* studies are required to verify the performance of these alternative coinitiators in the composite materials, mainly when in contact with oral tissues and the stomatognathic system.

Key words: Resin composites, Photopolymerization, Coinitiators.

Introduction

The composite resins available on the market today are mostly light-cured resins. So, photoinitiator molecules are included in these materials which have the ability to absorb light, and as result, generate free radicals which initiate the polymerization of these resin materials [1].

The light curing systems most commonly employed in the composites are the camphorquinone/amine system. The photoinitiator is camphorquinone, which requires a coinitiator to perform the polymerization process. Tertiary amines (aliphatic or aromatic) do not absorb light, but interact with the activated camphorquinone to produce reactive species [2,3]. However, this photoinitiator system has some disadvantages, such as the tendency to promote yellowing to resin materials [4,5] low compatibility with oral tissues [6-8] and even mutagenic characteristics [9].

It is well understood that factors such as type of photoinitiator [10-12], photoinitiator/coinitiator ratio [13,14], type and concentration of coinitiator [10,15] may influence the properties of the resin materials. These properties range from polymerization rate, degree of conversion, the shrinkage stress, the (micro)hardness, aesthetic impairment and biocompatibility of the materials.

For certain resinous systems, one way to reduce toxicity, enhance color stability without compromising the physical and mechanical properties of polymers with camphorquinone/amine is to explore new substitutes already used on the market [16-18]. These molecules must show high reactivity and high degree of monomer conversion, since no reactive monomers may diffuse out of the polymer matrix to the oral cavity [16]. Based on the aforementioned facts, the objective of this review was to discuss the evolution of the coinitiators of

composite resins, focusing on their physico-chemical, mechanical and biological characteristics.

Review

This review covered literature from 1990 to 2013 and only papers with the key words of interest were included: "coinitiators", "amines", "composite resins", "photopolymerization". The search used full-text papers from PubMed and Science Direct databases. It was included only English papers, and meeting abstracts and short communications were excluded. Hand search of the references completed the review.

The first composite materials commercially available were based on Bisphenolglycidylmethacrylate (Bis-GMA) with chemical polymerization, or self-cured resins. This reaction was produced by mixing two pastes, one containing the initiator and the other an activator product, benzoyl peroxide and Dimethyl Paratoluidine (DMT), a tertiary amine, respectively. However, the chemically cured resins had some disadvantages: it is impossible to control working time, color instability [19], high viscosity [20]. It did not take so far for the photoactivated resins being widely used by dentists. The first commercially available light-cured resin composite was NuvraFil (Dentsply). Among its advantages over chemical resins, some are listed: a single paste, which did not require mixing and full control of working time by the operator, with fast curing and start at the operator's command [1,21], as well as easy sculpture [21]. Briefly, the reaction of curing includes three stages: 1) initiation: after the incidence of blue light (wavelength 468 nm) on the composite resin, Camphorquinone (CQ) enters the exciplex state, making it able to react with the coinitiator (one electron transfer to the amine). From this reaction free radicals, which show reactivity to break the unsaturated carbon bonds of the

Corresponding author: John Alexis Dominguez, Alameda Nebuco de Arango 422 - Ponta Grossa, Paraná, Brazil; Tel: 55-42-32245164; Fax: 55-42-32241166; e-mail: johnalexis.dominguez@gmail.com

LITERATURE REVIEW

Alternative Coinitiators Applicable to Photocurable Resin Composites

Bruna Fortes BITTENCOURT¹, John Alexis DOMINGUEZ¹, Paulo Vitor FARAGO², Luis Antonio PINHEIRO³, Osnara Maria Mongruel GOMES¹

¹ *Department of Dentistry, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.*

² *Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, Paraná, Brazil.*

³ *Department of Materials Engineering, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, Paraná, Brazil.*

KEY WORDS: Resin composites, Photopolymerization, Coinitiators.

Corresponding author:

Bruna Fortes Bittencourt

Address: Rua Santos Dumont, 1331 - Ponta Grossa, Paraná, Brazil

CEP: 84010-360

Telephone: 55-42-32245164 Fax: 55-42-32241166

Email: brubita@hotmail.com

ABSTRACT

This review aimed to examine the evolution of the composite resins's photoinitiator system, with emphasis on those developed in recent years. This review covered literature from 1990 to 2013 and only papers with the key words of interest were included: "coinitiators", "amines", "composite resins", "photopolymerization". The search used full-text papers from PubMed and Science Direct databasis. It was included only English papers, and meeting abstracts and short communications were excluded. Hand search of the references completed the review. A total of 29 articles were studied. Many cointiators are being researched as an alternative to traditional tertiary amines, particularly in order to improve the physical and mechanical properties of the final polymer and its biocompatibility with oral tissues. Polymerizable amines, natural compounds, and cointiators with low toxicity and antiseptic properties were studied, and the results found they would be promising substitutes. These materials must present appropriate concentration and reactivity to obtain adequate physical and mechanical properties and high biocompatibility. However, further *in vivo* studies are required to verify the performance of these alternative cointiators in the composite materials, mainly when in contact with oral tissues and the stomatognathic system.

INTRODUCTION

The composite resins available on the market today are mostly light-cured resins. So, photoinitiator molecules are included in these materials which have the ability to absorb light, and as result, generate free radicals which initiate the polymerization of these resin materials¹⁾.

The light curing systems most commonly employed in the composites are the camphorquinone/amine system. The photoinitiator is camphorquinone, which requires a cointiator to perform the polymerization process. Tertiary amines (aliphatic or aromatic) do not absorb light, but interact with the activated camphorquinone to produce reactive species^{2,3)}. However, this photoinitiator system has some disadvantages, such as the

tendency to promote yellowing to resin materials^{4,5)} low compatibility with oral tissues⁶⁻⁸⁾ and even mutagenic characteristics⁹⁾.

It is well understood that factors such as type of photoinitiator¹⁰⁻¹²⁾, photoinitiator/coinitiator ratio^{13,14)}, type and concentration of coinitiator^{10,15)} may influence the properties of the resin materials. These properties range from polymerization rate, degree of conversion, the shrinkage stress, the (micro)hardness, aesthetic impairment and biocompatibility of the materials.

For certain resinous systems, one way to reduce toxicity, enhance color stability without compromising the physical and mechanical properties of polymers with camphorquinone/amine is to explore new substitutes already used on the market¹⁶⁻¹⁸⁾. These molecules must show high reactivity and high degree of monomer conversion, since no reactive monomers may diffuse out of the polymer matrix to the oral cavity¹⁶⁾. Based on the aforementioned facts, the objective of this review was to discuss the evolution of the coinitiators of composite resins, focusing on their physico-chemical, mechanical and biological characteristics.

REVIEW

This review covered literature from 1990 to 2013 and only papers with the key words of interest were included: "coinitiators", "amines", "composite resins", "photopolymerization". The search used full-text papers from PubMed and Science Direct databasis. It was included only English papers, and meeting abstracts and short communications were excluded. Hand search of the references completed the review.

The first composites materials commercially available were based on bisphenolglycidylmetacrilate (Bis-GMA) with chemical polymerization, or selfcured resins. This reaction was produced by mixing two pastes, one containing the initiator and the other an activator product, benzoyl peroxide and dimethyl paratoluidine (DMT), a tertiary amine, respectively. However, the chemically cured resins had some disadvantages: it is impossible

to control working time, color instability¹⁹⁾, high viscosity²⁰⁾. It did not take so far for the photoactivated resins being widely used by dentists. The first commercially available light-cured resin composite was NuvaFil (Dentsply). Among its advantages over chemical resins, some are listed: a single paste, which did not require mixing and full control of working time by the operator, with fast curing and start at the operator's command^{1,21)}, as well as easy sculpture²¹⁾. Briefly, the reaction of curing includes three stages: 1) initiation: after the incidence of blue light (wavelength 468 nm) on the composite resin, camphorquinone (CQ) enters the exciplex state, making it able to react with the coinitiator (one electron transfer to the amine). From this reaction free radicals, which show reactivity to break the unsaturated carbon bonds of the monomer, through hydrogen abstraction, called the propagation phase (2) are formed. These monomers are connected to other monomers that have been broken, in a chain reaction, forming the polymer. Finally, the termination (3) occurs when the active two chain ends react together and form an inactive macromolecule, ending the chain growth^{1,22,23)}.

Tertiary amines are commonly used as coinitiators because they facilitate the formation of alpha-amino alkyl radicals and due to its high reactivity at lower concentrations²⁴⁾. The polymerization reaction of the composites depends not only on the reactivity of the amines as coinitiator, but also the molar absorption coefficient of the photoinitiator, which is the ability of this molecule (usually CQ) to absorb photons of the light unit and generate free radicals in its excitatory state¹⁾. The primary amines used in the photoactivated composites are basically dimethylaminoethylmetacrylate (DMAEMA) and ethyl-4-dimethylaminobenzoate (EDMAB).

Some disadvantages of aromatic tertiary amines may be verified, as previously mentioned. Historically, Brauer et al.²⁴⁾ (1979) analyzed 15 different types of aromatic tertiary amines on chemically activated resins, and found that all these amines showed color change in different degrees. Schneider et al.⁵⁾ (2008) and Schneider et al.¹⁰⁾ (2009) found that the concentration of the photoinitiator/coinitiator system is responsible for a greater degree of

yellowing of the composite. The biocompatibility of aromatic tertiary amines is the most worrying feature of these components, subject of many studies. Vasquez et al.⁷⁾ (1997) studied the biocompatibility (by intravenous injection in rats) of alternative amines compared to DMT used for the polymerization of bone cements: 4-Dimethylaminobenzyl alcohol (DMOH) and 4-dimethyl-aminobenzylmethacrylate (DMMO). Alternative coinitiators were shown three times less toxic compared to DMT, and favorable mechanical characteristics to bond cements. Liso et al.⁶⁾ (1997) also found that in terms of acute toxicity and cytotoxicity, both DMOH and DMMO amines are less aggressive than DMT, and some antiseptic characteristics, which was very interesting for orthopedics and dentistry, as these materials keep in contact with human tissues. Masuki et al.²⁵⁾ (2007) assessed the necrotic potential of camphorquinone, benzoyl peroxide, DMT and DMAEMA on human gingival fibroblasts and concluded that the 4 components of resin materials exhibited a necrotic effect.

Also, it was verified that Bis-GMA based-materials had no complete conversion of the carbon double bonds and polymerization shrinkage, the latter resulting in stress development on tooth structure^{26,27)}. And these characteristics were directly related to several factors, among them the photoinitiator/coinitiator system, which may be:

1 - With respect to the photoinitiator type: Schneider et al.⁵⁾ (2008) evaluated CQ, phenylpropanedione (PPD) and the combination of CQ/PPD on degree of conversion (DC) and the maximum degree of polymerization (MDP), verifying that the PPD and the combination of CQ/PPD decreased this latter property, which in turn is influenced by the power intensity absorption, and the degree of conversion. Schneider et al.¹²⁾ (2009) evaluated the same groups of the previous study on characteristics such as the shrinkage stress, DC, MDP and cross-linking density. They found that the combination of CQ/PPD may be promising, since the developing stress was decreased, without compromising the final properties of the polymer. Leprince et al.¹⁵⁾ (2011) compared Lucirin-TPO (TPO) and CQ on the DC and depth of cure of composites, and observed that the DC is higher for samples made of TPO, while the depth of cure is higher for samples with CQ. Costa Oliveira et al.¹¹⁾

(2012) also evaluated the polymerization stress in experimental resins formulated with CQ, PPD or combination of both, as well as two commercial resins (Filtek Z250 and Filtek Silorane) finding that just silorane-based resin decreased the effects of stress polymerization, thus decreasing gap formation. Cunha Brandt et al.²⁸⁾ (2013) assessed three types of combinations of photoinitiators (CQ, PPD, CQ/PPD) on various mechanical properties including compressive strength, diametral strength, elastic modulus and DC. It was found that the photoinitiators behaved similarly, concerning the properties analyzed.

2 - Photoinitiator/coinitiator ratio: Schneider et al.¹²⁾ 2009 evaluated 4 experimental resins with different CQ/EDMAB ratios (2:1, 1:1, 1:1.15, 1:2) on DC and MDP. The higher the EDMAB ratio, the greater the final properties of the polymer. Musanje et al.¹³⁾ (2009) evaluated 25 experimental conditions to see which CQ/EDMAB ratio was ideal to have maximum DC and minimal stress development. They concluded that there are several combinations of CQ/EDMAB which generate an appropriate degree of polymerization of composite resins, but to have a low degree of shrinkage stress, QC/EDMAB should be decreased, which, in turn, compromises properties such as DC and surface hardness of the polymer.

3 - The type and concentration of the coinitiator also has great influence on the final properties of the polymer. Among the innovations, new coinitiators, substitutes for conventional DMT amines, DMAEMA and EDMAB, were developed:

A- 'natural' coinitiators (Benzodioxole BDO, sesamin and its derivatives): Liu et al.²⁹⁾ (2007) evaluated BDO and piperonylalcohol benzodioxole (PA). The properties evaluated were: DC, modulus and glass transition temperature, as well as sorption and solubility, which showed excellent results. Thus, the authors concluded that BDO and PA would be viable alternatives to conventional amines. Shi, Nie¹⁶⁾ (2007) evaluated BDO and compared it to EDMAB in combination with CQ at different concentrations (0, 0.5, 1.0 and 2.0wt% of EDMAB and BDO, and 0, 0.2, 0.5, 0.8, and 1.0wt% of CQ) and a combination of both. It was evaluated the

same properties as Liu et al.²⁹⁾ (2007), and found a similar behavior to the resins formulated with EDMAB or BDO. For the authors, the BDO is a promising alternative coinitiator to conventional amines. Shi, Nie³⁰⁾ (2007) observed the potential of 3,4-methoxymethacrylate methylenedioxybenzene (MDBMM) as coinitiator, showing favorable results in terms of DC and reactivity, comparable to control (DMAEMA). This coinitiator presents benzodioxole and methacrylate radicals, acting also like a photopolymerizable amine. Wang et al.¹⁸⁾ (2009) synthesized and characterized sesamin, and compared some of its mechanical properties and cytotoxicity with EDMAB. The results showed that although DC of the resin with sesamin were slightly lower than EDMAB samples, the tendency to yellowing was lower and the values of sorption and solubility were similar, with satisfactory biocompatibility. Shi³¹⁾ (2010) synthesized and characterized three derivatives of BDO (MDBMM; 3,4-methylenedioxybenzene methoxylacetate -MDBMA; sesamolmethacrylate -SMA), measuring their reactivity, mechanical properties and cytotoxicity of Bis-GMA and TEGDMA polymers. The EDMAB and DMAEMA were used for comparison purposes. The results showed that the derivatives of BDO demonstrated high reactivity to generate free radicals and mechanical properties comparable to controls, and also high biocompatibility.

B - polymerizable amines: Nie, Bowman³²⁾ (2002) evaluated NDMH (N'-dimethyl,-N'-di[methacryloxyethyl]-1,6-hexanediamine) with two different functions: as a possible substitute for the conventional coinitiator and as a substitute for the diluent monomer TEGDMA. It was performed the synthesis and characterization of NDMH and tests of DC, glass transition temperature, elastic modulus were made. Sorption and solubility were also measured, and a conventional curing system (Bis-GMA/TEGDMA/CQ/EDAB) was examined as control. The concentration ranged from 0.05 to 4wt% of NDMH in the experimental groups. NDMH has been found to be a possible substitute to conventional amine and diluent monomer, as similar physical properties to control were found. Also, Wu, Nie³³⁾ (2006) evaluated the two most common coinitiators (EDMAB and DMAEMA) and an alternative one: DMPDA (N,N-dimethyl-N 'N'-di[2-(methacryloyl)ethoxycarbonyl] propyldiamine) in

concentrations ranging from 0 to 0.5wt%. After performing the synthesis and characterization of the alternative coinitiator, the following properties were evaluated: DC, modulus and glass transition temperature, sorption and solubility. The results showed that resin blends made of DMPDA in the concentration of 0.5wt% was the one with the lowest DC and the lower final value of conversion of carbon double bonds, lower than the commercially available amines. Wu, Nie¹⁷⁾ (2007) also synthesized and characterized the 3-diethylamino-propionate methacrylate (EGDPM), comparing it with EDMAB and DMAEMA coiniciators. It was evaluated the mechanical properties, sorption and solubility of the resin samples. The tests showed that despite groups had similar values of sorption and solubility, DC and the rate of polymerization of the resin made of EGDPM were lower than the controls EDMAB and DMAEMA, even at concentrations of 0.25wt%.

C - Among the coiniciators studied, a tertiary amine, developed by Vazquez et al.⁷⁾ (1997), DMOH, which is used in bone cements, was evaluated by Schroeder et al.¹⁴⁾ (2008) with the proposal to be an alternative coinitiator to resin-based Bis-GMA and TEGDMA materials with CQ. DMAEMA was used as control. The authors found high DC values, at lower concentrations (less than 0.25%). In this study, the effectiveness of CQ/DMOH, in terms of radical formation and final monomer conversion was higher than that of CQ/DMAEMA.

D-Barbituric Acid Derivatives: Münchow et al.³⁴⁾ (2013) on the premise that the EDMAB would be unstable in acidic environments, evaluated TBA (1,3-Diethyl-2-thiobarbituric acid) as possible coinitiator of an experimental adhesive. It was evaluated the kinetics of polymerization (KP), DC and the rate of polymerization. Six groups were made: Four of TBA containing different concentrations (0.1, 0.5, 1, and 2mol%), a free coinitiator sample and 1mol% of EDMAB (control). The results showed that DC increased as the concentration of TBA was higher, and the group with 2mol% of TBA showed the best results of DC and reactivity, being considered an efficient alternative coinitiator. Although this experiment was conducted with an experimental adhesive, the authors report it may be used with composite resins.

DISCUSSION

The effectiveness of CQ/tertiary amine system clinically affects important properties of the composite such as polymerization rate, depth of cure and the final DC³¹⁾. This efficiency is related to the concentration and the structure of the amine^{17,35)}. In almost all studies analyzed, the rate of polymerization and DC increased as the concentrations of coinitiators increased. However, besides the concentration, the reactivity of the molecule also has great influence on the properties of the final polymer. This reactivity is related to the chemical structure of tertiary amines⁴⁾. The reactivity reflects on the formation of aminoalkyl radicals, which in turn modulate the polymerization kinetics, especially in the early stages of this reaction. Thus, the physical and mechanical properties of the final polymer will be directly linked to the type and concentration of the amine used in photoinitiator system^{31,35,36)}. Is due to these characteristics the fact that studies analyzing different concentrations of the same coinitiator found better mechanical properties when there is an increased concentration of them^{10,33,34)}, and studies that evaluated different coinitiators found that the one which presented the best physical-mechanical properties of the final polymer also showed higher reactivity^{14,16,31,35)}.

Generally, tertiary amines are more reactive. Among the tertiary amines, aromatic may generate more radicals than aliphatic amines³⁷⁾. This fact was observed in other study, which DMPDA -an aliphatic amine, showed the best results in DC, modulus and glass transition temperature, sorption and solubility, followed by DMAEMA (aliphatic, but lower reactive than DMPDA). And EDMAB (aromatic amine) showed the lower results³³⁾. Also, the DMAEMA radical-containing methacrylate, which acts as a photopolymerizable amine and may increases DC values and consequently the physical-mechanical properties of the polymer, even when used in small quantities³⁵⁾.

A review about the substances released by resin restorative materials clearly demonstrated that molecules incorporated to resin composites are able to cause toxic and

genotoxic effects in relevant concentrations in the oral cavity³⁸). From these studies, it was found that the main concern with amines is actually their biocompatibility. In some studies, it was suspected that they would be mutagenic⁹). Conventional amines, with low molecular weight, do not polymerize and spread to adjacent tissues and oral environment, and due to its basic character, become damaging to tissue⁴). Some alternatives have been proposed to reduce this diffusion to as minimum as possible. One of them was to incorporate a polymerizable amine, by adding a methacrylate radical^{17,32,33}). This copolymerization with the monomer through the methacrylate group increases the biocompatibility of the final polymer, as increased DC values are obtained, which leads to a reduced release of the material components in the oral cavity¹⁷). Another alternative was the use of natural coinitiators for resin composites, as the benzodioxole derivatives and sesamin. In the analyzed studies, besides these natural coinitiators present high reactivity at low concentrations, appropriate physical and mechanical properties were found^{16,29-31}). Also, Wang et al.¹⁸) (2009) showed in an *in vitro* study, low cytotoxicity of the natural derivatives.

The inclusion of coinitiators used in orthopedic bone cements was also verified for composites. Schroeder et al.¹⁴) (2008), proved that DMOH was a promising alternative, due to its higher reactivity compared to DMAEMA, even at low concentrations. This coinitiator also demonstrates highly biocompatible and, in other studies that evaluated DMOH in bone cements, its antiseptic and bactericidal properties were clearly positive^{6,7,39}).

Based on what was raised by this review, the alternative is to explore possible replacements for amines commonly used in the composites, so that new coinitiators may be used in the formulations of these materials. Their great evolutions have spin around the development of materials with high mechanical properties, and few industries are concerned to develop resins with high biological properties³⁸). The coinitiators must not only exhibit high reactivity at low concentrations to produce a final polymer with high physical and mechanical properties as well as high biocompatibility. Likewise these molecules must be capable to form highly radicals to break the unsaturated carbon bonds of the monomers and reaching

high conversion, producing a minimum amount of residual monomers, since they also have potential cytotoxic effects to oral tissues.

CONCLUSIONS

It may be concluded that many alternative coinitiators have been analyzed and most of these substances show promising results. These coinitiators should present appropriate concentration and reactivity to obtain adequate physical and mechanical properties and high biocompatibility. However, further *in vivo* studies are needed to verify the performance of these alternative coinitiators in the composites, especially in order to verify their interaction with oral tissues and in function with stomatognathic system.

REFERENCES

1. Stansbury JW. Curing dental resins and composites by photopolymerization. *J Esthet Dent* 2000; 12: 300-308.
2. Jakubiak J, Allonas X, Fouassier JP, Sionkowska A, Andrzejewska E, Linden LA, et al. Camphorquinone-amines photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization. *Polymer* 2003; 44: 5219-526.
3. Jakubiak J, Wrzyszczyński A, Linden LA, Rabek JF. The role of amines in the Camphorquinone photoinitiated polymerization of multifunctional monomer. *J Macromol Sci* 2007; 44: 239-242.
4. Bowen RL, Argentar H. Tertiary Aromatic Amine Accelerators with Molecular Weights Above 400. *J Dent Res* 1972; 51: 473-482.
5. Schneider LFJ, Pfeifer CSC, Consani S, Prahl SA, Ferracane JL. Influence of photoinitiator type on the rate of polymerization, degree of conversion, hardness and yellowing of dental resin composites. *Dent Mater* 2008; 24: 1169-1177.
6. Liso PA, Vazquez B, Rebuelta M, Hernandez ML, Rotger R, San Roman J. Analysis of the leaching and toxicity of new amine activators for the curing of acrylic bone cements and composites. *Biomaterials* 1997; 18: 15–20.
7. Vázquez B, Elvira C, Levenfeld B, Pascual B, Goni I, Gurruchaga M, et al. Application of tertiary amines with reduced toxicity to the curing process of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res* 1997; 34: 129–136.
8. Achilias SD, Sideridou ID. Kinetics of the benzoyl peroxide/amine initiated free-radical polymerization of dental dimethacrylate monomers: experimental studies and

- mathematical modeling for TEGDMA and Bis-EMA. *Macromolecules* 2004; 37: 4254–4265.
9. Kucybala Z, Pietrzak M, Paczkowski J. Kinetic studies of a new photoinitiator hybrid system based on Camphorquinone-N-phenylglycine derivatives for laser polymerization of dental restorative and stereolithographic (3D) formulations. *Polymer* 1996; 37: 4585-4591.
 10. Schneider LF, Consani S, Sakaguchi RL, Ferracane JL. Alternative photoinitiator system reduces the rate of stress development without compromising the final properties of the dental composite. *Dent Mater* 2009; 25: 566-572.
 11. Costa Oliveira KM, Consani S, Gonçalves LS, Brandt WC, CCahuana-Vásquez RA. Photoelastic evaluation of the effect of composite formulation on polymerization shrinkage stress. *Braz Oral Res* 2012; 26: 202-208.
 12. Schneider LF, Cavalcante LM, Consani S, Ferracane JL. Effect of co-initiator ratio on the polymer properties of experimental resin composites formulated with camphorquinone and phenyl-propanedione. *Dent Mater* 2009; 25: 369-375.
 13. Musanje L, Ferracane JL, Sakaguchi RL. Determination of the optimal photoinitiator concentration in dental composites based on essential material properties. *Dent Mater* 2009; 25: 994-1000.
 14. Schroeder WF, Cook WD, Vallo CI. Photopolymerization of *N,N*-dimethylaminobenzyl alcohol as amine co-initiator for light-cured dental resins. *Dent Mater* 2008; 24: 686-693.
 15. Leprince JG, Hadis M, Shortall AC, Ferracane JL, Devaux J, Leloup G, et al. Photoinitiator type and applicability of exposure reciprocity law in filled and unfilled photoactive resins. *Dent Mater* 2011; 27: 157-164.
 16. Shi S, Nie J. A Natural Component as Coinitiator for Unfilled Dental Resin Composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 82: 44-50.
 17. Wu G, Nie J. Synthesis and evaluation of ethylene glycol 3-diethylamino-propionate methacrylate as a polymerizable amine coinitiator for dental application. *Dent Mater* 2007; 23: 623-629.
 18. Wang K, Yang D, Xiao M, Chen X, Lu F, Nie J. Sesamin as a co-initiator for unfilled dental restorations. *Acta Biomater* 2009; 5: 2508-2517.
 19. Bowen RL, Rodriguez MS. Tensile strength and modulus of elasticity of tooth structure and several restorative materials. *J Am Dent Assoc* 1962; 64: 378-387.
 20. Rueggeberg FA. From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent* 2002; 87: 364-379.
 21. Sheykhholeslan Z, Houpt MI. Use of the ultraviolet light polymerized adhesive (Nuva-Seal and Nuva-Fil) in clinical Dentistry. *Quintessence Int Dent Dig* 1979; 10: 17-21.

22. Anusavice KJ. Phillips` Science of Dental Materials. 13 ed. St Louis: Elsevier Health Sciences; 2003. 832p.
23. Reis A, Loguercio AD. Materiais Dentários Diretos: dos fundamentos à aplicação clínica. 1a ed. São Paulo: Santos, 2009. 423p.
24. Brauer GM, Dulik DM, Antonucci JM, Termini DJ, Argentar H. New Amine Accelerators for Composite Restorative Resins. J Dent Res 1979; 58: 1994-2000.
25. Masuki K, Nomura Y, Bhawal UK, Sawajiri M, Hirata I, Nahara Y, et al. Apoptotic and Necrotic Influence of Dental Resin Polymerization Initiators in Human Gingival Fibroblast Cultures. Dent Mater J 2007; 26: 861–869.
26. Lovelth LG, Newman SM, Bowman CN. Behavior of Dimethacrylate Dental Resins The Effects of Light Intensity, Temperature, and Comonomer Composition on the Polymerization. J Dent Res 1999; 78: 1469-1476.
27. Cramer NB, Stansbury JW, Bowman CN. Recent Advances and Developments in Composite Dental Restorative Materials. J Dent Res 2011; 90: 402-416.
28. Brandt WC, Silva CG, Frollini E, Souza-Junior EJ, Sinhoreti MA. Dynamic mechanical thermal analysis of composite resins with CQ and PPD as photo-initiators photoactivated by QTH and LED units. J Mech Behav Biomed Mater 2013; 24: 21-29.
29. Liu S, Shi S, Hou G, Nie J. Benzodioxole derivative as coinitiator for dental resin. Acta Odontol Scand 2007; 65: 313-318.
30. Shi S, Nie J. Investigation of 3,4-Methylenedioxybenzene Methoxyl Methacrylate as Coinitiator and Comonomer for Dental Application. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 2007; 82B: 487–493.
31. Shi S, Xiao P, Wang K, Gong Y, Nie J. Influence of chemical structures of benzodioxole-based coinitiators on the properties of the unfilled dental resin. Acta Biomater 2010; 6: 3067-3071.
32. Nie J, Bowman CN. Synthesis and photopolymerization of N,N'-dimethyl,-N,N'-di(methacryloxy ethyl)-1,6-hexanediamine as a polymerizable amine coinitiator for dental restorations. Biomaterials 2002; 23: 1221-1226.
33. Wu G, Nie J. Synthesis and evaluation of N,N-dimethyl-N',N'-di[2-(methylacryloyl)-ethoxycarbnylethyl]propyldiamine as a coinitiator. J Photochem Photobiol A: Chem 2006; 183: 154-158.
34. Munchow EA, Valente LL, Peralta SL, Fernandez MR, Lima GS, Petzhhold CL, et al. 1,3-Diethyl-2-thiobarbituric acid as an alternative coinitiator for acidic photopolymerizable dental materials. J Biomed Mater Res Part B 2013; 10: 1217–1221.

35. Yoshida K, Greener EH. Effects of two amine reducing agents on the degree of conversion and physical properties of an unfilled light-cured resin. *Dent Mater* 1993; 9: 246-251.
36. Yoshida K, Greener EH. Effect of photoinitiator on degree of conversion of unfilled light-cured resin. *J Dent* 1994; 22: 296-299.
37. Cook WD. Photopolymerization kinetics of dimethacrylates using the camphorquinone/amine initiator system. *Polymer* 1992; 33: 600-609.
38. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular Toxicology of Substances Released from Resin-Based Dental Restorative Materials. *Int J Mol Sci* 2009; 10: 3861-3899.
39. de la Torre B, Salvado M, González Corchón MA, Vázquez B, Collía F, De Pedro JA, et al. Biological response of new activated acrylic bone cements with antiseptic properties. Histomorphometric analysis. *J Mater Sci: Mater Med* 2007; 18: 933–994.

4.2 Artigo em revisão na Revista Dental Materials, intitulado: *Correlation between degree of conversion measurements of resin-based dental materials: comparison of micro-Raman spectroscopy and FT-IR analyzes.*

De: **ees.dema.0.2b2f88.3eaaf703@eesmail.elsevier.com** em nome de **Dental Materials** (dentistry.dentmatj@manchester.ac.uk)
Enviada: segunda-feira, 11 de agosto de 2014 23:05:12
Para: brubita@hotmail.com

Dear Ms. Bruna Bittencourt,

Your submission entitled "Correlation between degree of conversion measurements of resin-based dental materials: comparison of micro-Raman spectroscopy and FT-IR analyzes" has been received by Dental Materials

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/dema/>.

Your username is: brubita@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/dema/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Dental Materials

ental materials

Contact us
Help ?


ELSEVIER

'My EES Hub' available for consolidated users ... [more](#)

[submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: [brubita@hotmail.com](#)
Switch To: [Author](#) Go to: [My EES Hub](#)

Version: [EES 2014.7](#)

eing Processed for Author Bruna Bittencourt

Page: 1 of 1 (1 total submissions)		Display 10 results per page.		
Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
DEMA-D-14-00482	Correlation between degree of conversion measurements of resin-based dental materials: comparison of micro-Raman spectroscopy and FT-IR analyzes	Aug 12, 2014	Aug 29, 2014	Under Review
Page: 1 of 1 (1 total submissions)		Display 10 results per page.		

<< Author Main Menu

Ponta Grossa – PR, Brazil, August 11, 2014.

Dear Editor-in-Chief,

Dr. David C. Watts,

We are sending the manuscript entitled: “Correlation between degree of conversion measurements of resin-based dental materials: comparison of micro-Raman spectroscopy and FT-IR analyzes” in order to submit it to your appraisal.

We state that the manuscript is not concurrently under consideration for publication in another journal, and all of the named authors were involved in the work leading to the publication of the paper and have read the paper before its submission. Also, none of the authors have any conflict of interest.

We would highly appreciate if this paper could be published in such a high quality Journal as “Dental Materials”. Thank you in advance and we are looking forward to hearing from you soon.

Sincerely,

Bruna Fortes Bittencourt SIGNATURE: _____



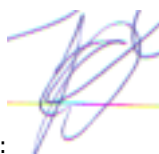
E-MAIL: brubita@hotmail.com

John Alexis Dominguez SIGNATURE: _____



E-MAIL: johnalexis.dominguez@gmail.com

Luis Antonio Pinheiro SIGNATURE: _____



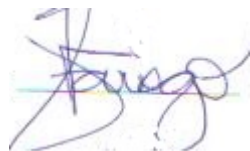
E-MAIL: lapinheiro@uepg.br

Simone do Rocio F. Sabino SIGNATURE: _____



E-MAIL: mone.sab@hotmail.com

Paulo Vitor Farago SIGNATURE: _____



E-MAIL: pvfarago@gmail.com

Osnara Maria Mongruel Gomes SIGNATURE: _____



E-MAIL: osnaramgomes@uol.com.br

Correlation between degree of conversion measurements of resin-based dental materials: comparison of micro-Raman spectroscopy and FT-IR analyzes

Bruna Fortes Bittencourt¹, John Alexis Dominguez¹, Luis Antonio Pinheiro², Simone do Rocio Ferraz Sabino³, Paulo Vitor Farago⁴, Osnara Maria Mongruel Gomes¹

¹ *Department of Dentistry, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.*

² *Department of Materials Engineering, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, Paraná, Brazil.*

³ *Department of Chemistry, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, Paraná, Brazil.*

⁴ *Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, Paraná, Brazil.*

Corresponding author:

Bruna Fortes Bittencourt

State University of Ponta Grossa – Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil - 84030-900. Telephone and Fax: +55 42 3220 3741

Email: brubita@hotmail.com

Correlation between degree of conversion measurements of resin-based dental materials: comparison of micro-Raman spectroscopy and FT-IR analyzes

Abstract

Objective: to evaluate three different methodologies to analyze degree of conversion (DC) from three experimental composites, modifying the photoinitiator/coinitiator concentration. Methods: experimental composite resins were mixed with 0.2, 0.5 and 1.2% CQ/DMAEMA. The molar ratio was kept constant at 1:1. After 24h, the specimens were submitted to the three methodologies, on order to evaluate DC values: micro-Raman spectroscopy, FT-IR ATR, and FT-IR using KBr pellets. The results were analyzed by 2-way ANOVA and Tukey's post-test. The correlation between the three methodologies was analyzed by multiple linear regression. The confidence of the association strength between these properties was estimated by t and F test, with 95% confidence. Results: Two-way ANOVA with Tukey's post-test showed statistically differences between the factor methodology ($p < 0.05$), but not for the photoinitiator/coinitiator concentration in each methodology ($p > 0.05$). The highest values were obtained from Raman spectroscopy, and the lowest from FT-IR with KBr, and intermediary values for FT-IR ATR, being these values statistically different ($p < 0.05$). The attributed value for r^2 was 0.95, which demonstrated strong and positive correlation between the methodologies. The factor methodology influenced DC values, whether the factor photoinitiator/coinitiator concentration did not influence the response. Significance: the three methodologies have a strong positive correlation between them and may influence DC values, in the sequence: Raman > FT-IR ATR > FT-IR with KBr.

Key-words: composite resin, degree of conversion, dental material.

1. Introduction

Photoactivated resin based materials have been widely used in dentistry, due to its various indications: adhesives, cements, and composite resins. This photopolymerization process is formed by the union of monomers, which generate a polymeric chain. To make it happen, a photoinitiator molecule must be able to react with a coinitiator and form free radicals, which break the saturated carbon bonds of the monomer and then form the polymer [1,2]. Briefly, the reaction of curing includes three stages: 1) initiation: after the incidence of blue light (wavelength 468 nm) on the composite, camphorquinone enters the exciplex state, making it able to react with the coinitiator (one electron transfer to the amine). From this reaction, free radicals are formed, which show reactivity to break the unsaturated carbon bonds of the monomer, through hydrogen abstraction, called the propagation phase (2) are formed. These monomers are connected to other monomers that have been broken, in a chain reaction, forming the polymer. Finally, the termination (3) occurs when the active two chain ends react together and form an inactive macromolecule, concluding the chain growth [1,3].

Once this photopolymerization reaction is understood and it is verified that carbon double bonds decrease (as vinyl functions converted to aliphatic functions) [4-7], the carbon double bonds that react may be quantitatively evaluated by different methods; the so-called degree of conversion (DC). This property of dental resin-based composites is a key physical-chemical property of the polymer since functional material characteristics, such as mechanical properties are significantly correlated [8-10]. It is well understood that factors such as type of photoinitiator [11-13],

photoinitiator/coinitiator ratio [14,15], type and concentration of coinitiator [16,17] may influence the properties of the resin-based materials.

Several methodologies are extensively employed to investigate DC. Among them, Raman spectroscopy [6,18-21] and Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) [22-29]. Although both techniques are based in an interaction process between sample irradiation, each technique is supported by a different physical phenomenon. Raman spectroscopy is a photonic technique which provides high-resolution chemical and structural information of an organic and / or inorganic compound, thereby enabling their identification. This analysis is based on the material's light-scattered, with the incidence of a monochromatic light. The scattered light that has different frequencies of the incident radiation is the one which provides information about the molecular composition of the sample and is called Raman scattering, or Raman frequencies [30].

On the other hand, infrared spectroscopy works by absorption: the technique analyzes the atomic vibration when the molecule receives a specific radiation. The spectrum is obtained by the passage of this radiation through the sample and the absorbed incident radiation at a specific energy. The energy of each peak of the absorbance spectrum is related to the molecular vibration frequency of the sample under study. The most traditionally test is FT-IR (Fourier transformed-Infrared spectroscopy), due to the high sensitivity, resolution and speed of registration. It is based on interference of two beams of radiation, which results in an interferogram, converted in spectrum by the Fourier transformation. Other technique used to evaluate DC at FT-IR is transmittance (the logarithmic inverse of absorbance), a method which the radiation passes through the sample, and is the most common analysis for solid compounds. In transmittance, tablets of the material are tested with

KBr (bromide potassium), since this compound is fully transparent in the infrared region [31].

Considering the physical peculiarities of each method and the importance of DC, it seems beneficial to dental researchers examine whether these techniques allow comparisons between the obtained data by different articles and / or DC methodologies. Thus, the aim of this study is to verify the correlation between the values obtained by the DC tests: FT-IR with and without diffuse reflectance attachment (ATR), and micro-Raman spectroscopy; also three experimental composite blends were evaluated by modifying the photoinitiator/coinitiator concentration. The null hypotheses were: (1) the methodology or (2) the photoinitiator/coinitiator concentration would not influence DC values.

2. Material and methods

2.1. *Experimental resins preparation*

Three experimental groups were analyzed. Composition of each blend is showed in Table 1. The organic phase was prepared with 70/30wt% of Bis-GMA/TEGDMA (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA). The photoinitiator was camphorquinone (CQ, Sigma Aldrich) and the coinitiator was a tertiary amine, dimethylaminoethylmetacrylate (DMAEMA, Sigma Aldrich). The CQ/DMAEMA molar ratio was kept constant (1:1), varying only the concentration (0.2, 0.5, or 1.2). The inhibitor 2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol (BHT, Sigma Aldrich) was used at a constant amount (0.1wt%). The inorganic portion consisted of silanated barium disilicate glass (65wt%, Esstech Inc., Essington, PA, USA). The experimental composite resins were homogeneously mixed for 1 min at 2400 rpm (DAC 150.1 FV SpeedMixer, Flacktek, Landrum, SC, USA), in dark environment.

2.2. *micro-Raman Spectroscopy*

For micro-Raman spectroscopy, the specimens were made in a metallic matrix of 2 mm thick and 5 mm diameter (n=6). To standardize the surface smoothness of the specimens, the matrices were placed over a mylar strip (Mylar, DuPont, Wilmington, DEL, USA) and a glass slide. The matrix was filled by composite resin, and a new mylar strip was positioned over the composite/matrix set. Then, another glass slide was used, with a 1kg-weight device, in order to obtain a flat and smooth composite surface. Only the upper glass slide was removed, and the specimens were photocured (Radii PLUS, SDI, Bayswater, Victoria, Australia) for 20 seconds, with a power intensity of 1000 mW/cm². The specimens were kept in a dark room for 24h until the DC test.

Raman spectroscopy was done in Micro-Confocal Raman (Bruker SENTERRA) connected to a microscope (Olympus, BX51M) and a charge-coupled device (CCD), with an automatic adjustment of 3-5cm⁻¹ resolution. The spectrometer consisted of a 20 mW green laser beam (532 nm wavelength). Raman back-scattered light was collected through the objective (20X). The slit width of the spectrograph was set at 25 µm. Accumulation time per spectrum was 30 seconds and 5 spectra were taken per point. The spectral region analyzed was 1785-875 cm⁻¹. An image system and high-resolution monitor were used to allow correct positioning of the laser. Each specimen was mounted at the focus of the objective to investigate differences in DC between the groups. Raman spectra were obtained as follows: 1,637 cm⁻¹ peak indicates aliphatic C=C double bonds of the resin, and 1,608 cm⁻¹ peak represents the C=C bonds in aromatic rings of the Bis-GMA molecules, the internal standard. The ratios of the area at 1,637 and 1,608 cm⁻¹ for both the monomer and polymer using the follow equations: $R_{\text{polymer}} = \text{Area } 1,637 \text{ cm}^{-1} / \text{Area}$

1,608 cm^{-1} in polymerized adhesive, and $R_{\text{monomer}} = \text{Area } 1,637 \text{ cm}^{-1} / \text{Area } 1,608 \text{ cm}^{-1}$ in adhesive monomer before light polymerization, arranged on a glass slide. The DC of the resin was calculated using Equation 1.

$$\text{DC} = 1 - \frac{R_{\text{Polymer}}}{R_{\text{monomer}}} \cdot 100 \quad (1)$$

2.3. FT-IR with Diffuse Reflectance Attachment (ATR)

The specimens (n=6) were made as the same way as for micro-Raman. FT-IR (IR Prestige-21, Shimadzu, Japan) was coupled to a diffuse reflectance attachment (DRS-8000, Shimadzu, Japan) device consisting of a diamond crystal of 2 mm diameter. Absorbance spectra were obtained over the range of 400 to 4000 cm^{-1} . Six measurements were taken at a resolution of 4 cm^{-1} and 64 scans. The same peaks (1608 and 1637 cm^{-1}) and equation above were used to calculate DC.

2.4. FT-IR with KBr

New specimens were made for this test, under the same conditions as previously mentioned (n=6). After 24 h, the middle of the composite resin specimen was pulverized and maintained in a dark room until the moment of the FT-IR (IR Prestige-21) analyses. One milligram of the ground powder was thoroughly mixed with 100 mg of KBr powder salt. This mixture was placed into a pelleting device and then pressed in a hydraulic press (SSP-10A model, Shimadzu, Tokyo, Japan) with a load of 80 KN during 3 min to obtain a pellet. The pellet was placed into a holder attachment into the spectrometer. Uncured composites were also made in the same way. The absorbance spectra of both uncured and cured samples were analyzed using in the range of 400 to 4000 cm^{-1} operating under the following conditions: 64

scans and 4 cm^{-1} resolution. DC was calculate using the same peaks and equation used for the other tests.

2.5. Statistical Analysis

Mean DC of each group was used for statistical analysis. Data from the three methodologies were subjected to two-way ANOVA (composite vs. methodology) and Tukey`s test ($\alpha=0.05$).

The correlation between the three methodologies was analyzed by multiple linear regression. The confidence of the association strength between these properties was estimated by t and F test, with 95% confidence.

3. Results

Considering the replication between individual conditions, the higher variation coefficient found was 6.43 for DMAEMA1.2% analyzed in FT-IR ATR. Table 2 showed the mean and standard deviation of DC values of each experimental group. Two-way ANOVA with Tukey`s post-test showed statistically differences between the factor methodology ($p<0.05$), but not for the photoinitiator/coinitiator concentration in each methodology ($p>0.05$). The highest values were obtained from Raman spectroscopy, and the lowest from FT-IR with KBr, and intermediary values for FT-IR ATR, being these values statistically different ($p<0.05$). Multiple linear regression was performed in order to verify the influence of both variables (methodology and photoinitiator/coinitiator concentration). The respective coefficient magnitudes are shown on Figure 1. Surface graphic showed all obtained values from the experiment (Figure 2).

The attributed value for r^2 was 0.95, which demonstrated strong and positive correlation between the 3 methodologies. The factor methodology influenced DC values. The factor photoinitiator/coinitiator concentration did not influence the response. T test also showed positive correlation for the 2 factors. The value for MQR/MQR was 198.008, and $F= 2.90112$, which demonstrated the validity of regression.

4. Discussion

The importance of DC values for resin-based materials relies on several factors, such as physical and mechanical properties as polymerization rate, the shrinkage stress, the (micro)hardness, as well as aesthetic impairment and biocompatibility [32]. The influence of photoinitiator/coinitiator concentration in DC is well demonstrated in studies which demonstrated that the highest concentration produced the highest values [14,15,33]. However, higher coinitiator concentrations negatively influenced shrinkage stress of resin-based materials [15] and compromise the biocompatibility, as residual amine molecules would be higher [34]. Also, the yellowing effect is more accentuate [14]. In this way, CQ and amine concentrations should be as low as possible to guarantee adequate composite polymerization. So, optimal concentration of the photoinitiator system (the one which demonstrates high mechanical and physical properties without affect the resin shrinkage stress and biocompatibility) is still concern between researchers [11,14-16]. In this study, we used DMAEMA as amine coinitiator, which has higher DC and the best optical properties compared to other amines used in resin-based materials [35]. Also, the coinitiator has a methacrylate functional group, which is able to copolymerize with the monomer to form a more consistent polymeric chain, and enhance DC [36].

The second null hypothesis was confirmed. CQ/DMAEMA concentration did not influenced DC values, in any of the three tests. This study is in accordance with a previous study which analyzed CQ/DMAEMA concentrations and found that final double bond conversion was independent of DMAEMA concentration [16]. Yoshida et al. [36] demonstrated there is an optimal concentration of coinitiator, and even small DMAEMA amounts may ensure sufficient DC values. Thus, increased concentrations may not guarantee better polymerization properties. Different conclusions were found by Alonso et al. 2008 [37], where DC of 1% CQ/DMAEMA, in the same molar ratio, was higher than the specimens with 0.5% CQ/DMAEMA. Also, the same authors[38] found that highest concentrations of CQ/DMAEMA allows better marginal seal in dental cavities, which is related to the high DC values from the experimental composite.

Among the 3 methodologies employed to analyze DC, the mean values found in the literature is ~70% for Raman spectroscopy, 50-60% for FT-IR ATR, and ~30-60% for FT-IR with KBr, which are in accordance with our findings. These little discrepancies may be due to the experimental design of each study, including the strongest factor, which is the resin composition, as monomer type, filler content, and photoactivator/coinitiator system used.

The first null hypothesis was rejected. It was found high influence of the methodologies used to evaluate DC. Raman spectroscopy showed the highest values. This methodology overestimated DC values, as the method only measures the specimen surface. This is useful test for very small regions, as hybrid layers. The same observation was demonstrated for FT-IR ATR, which operates only at the top of the resin specimen, given the intermediate values, lower than micro-Raman.

On the other hand, FT-IR using KBr pellets the absorbance analyzes the homogeneity of the specimen, since they are pressed and the whole 2-mm of the resin composite received the IR incidence. It is an important fact, once all the photocured resin is evaluated, and is well known that the deepest portions of the specimens did not cure the same way as the shallower ones [39]. So, the deepest portions influenced negatively the DC values. Authors demonstrated that the deepest regions have different depth of cure than the surface, and the top is different from the bottom, where the light did not reach the monomer [39].

The multiple linear regression showed that technique is the most influential parameter on DC results. However, the coinitiator concentration parameter was not considered statistically significant. Also, although there is a positive and strong correlation between the three methodologies, it is not possible to compare DC values between the three analyzed methodologies, once it is verified that Raman spectroscopy demonstrated the highest values, whereas FT-IR with KBr showed the lowest ones; in other words, as the following sequence: FT-IR with KBr < FT-IR ATR < micro-Raman. Thus, the researchers should be alerted to compare their DC results exclusively with articles conducted under the same methodology.

5. Conclusion

The results showed that three methodologies have a strong positive correlation between them and may influence DC values, in the sequence: micro-Raman > FT-IR ATR > FT-IR with KBr. The photoinitiator/coinitiator concentrations used in the study did not influence DC values.

Acknowledgements

The authors would like to thank Esstech Inc. for the generous donation of the silanated barium borosilicate glass. The composites were manipulated at UNIBAN – São Paulo, Brazil, and the authors would like to thank Professors Dr. Camillo Anauate Netto and Dr. Roberta C. Alonso for cooperation with our study.

References

1. Stansbury JW. Curing dental resins and composites by photopolymerization. *J Esthet Dent*, 2000; 12: 300-308.
2. Jakubiak J, Wrzyszczyński A, Linden LA, Rabek JF. The role of amines in the Camphorquinone photoinitiated polymerization of multifunctional monomer. *J MacromolSci*, 2007; 44: 239-242.
3. Anusavice KJ. Phillips` Science of Dental Materials, 13 ed., St. Louis, Elsevier Health Sciences, 2003.
4. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res*, 2002; 59: 46–55.
5. Gauthier MA, Stangel I, Ellis TH, Zhu XX. A new method for quantifying the intensity of the C=C band of dimethacrylates dental monomers in their FTIR and Raman spectra. *Biomaterials*, 2005; 26: 6440–6448.
6. Miletic VJ, Santini A. Remaining Unreacted Methacrylate Groups in Resin-Based Composite With Respect to Sample Preparation and Storing Conditions Using Micro-Raman Spectroscopy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008; 87: 468–474.

7. Miletic V, Santini A. Micro-Raman Assessment of the Ratio of Carbon-Carbon Double Bonds of Two Adhesive Systems Cured with LED or Halogen Light-curing Units. *J Adhes Dent*, 2010; 12: 461-467.
8. Leprince JG, Palin WM, Vanacker J, Sabbagh J, Devaux J, Leloup G. Physico-mechanical characteristics of commercially available bulk-fill composites. *J Dent*, 2014; 42: 993-1000.
9. De Godoy Froes-Salgado N, Gajewski V, Ornaghi BP, Pfeifer CS, Meier MM, Xavier TA, Braga RR. Influence of the base and diluent monomer on network characteristics and mechanical properties of neat resin and composite materials. *Odontology*, 2014; 10.1007/s10266-014-0153-6.
10. Martim GC, Detomini TR, Schuquel IT, Radovanovic E, Pfeifer CS, Giroto EM. A urethane-based multimethacrylate mixture and its use in dental composites with combined high-performance properties. *Dent Mater*, 2014; 30: 155-163.
11. Schneider LFJ, Pfeifer CSC, Consani S, Prahl SA, Ferracane JL. Influence of photoinitiator type on the rate of polymerization, degree of conversion, hardness and yellowing of dental resin composites. *Dent Mater*, 2008; 24: 1169-1177.
12. Schneider LF, Consani S, Sakaguchi RL, Ferracane JL. Alternative photoinitiator system reduces the rate of stress development without compromising the final properties of the dental composite. *Dent Mater*, 2009; 25: 566-572.
13. Costa Oliveira KM, Consani S, Gonçalves LS, Brandt WC, CCahuana-Vásquez RA. Photoelastic evaluation of the effect of composite formulation on polymerization shrinkage stress. *Braz Oral Res*, 2012; 26: 202-208.

14. Schneider LF, Cavalcante LM, Consani S, Ferracane JL. Effect of co-initiator ratio on the polymer properties of experimental resin composites formulated with camphorquinone and phenyl-propanedione. *Dent Mater*, 2009; 25: 369-375.
15. Musanje L, Ferracane JL, Sakaguchi RL. Determination of the optimal photoinitiator concentration in dental composites based on essential material properties. *Dent Mater*, 2009; 25: 994-1000.
16. Schroeder WF, Cook WD, Vallo CI. Photopolymerization of *N,N*-dimethylaminobenzyl alcohol as amine co-initiator for light-cured dental resins. *Dent Mater*, 2008; 24: 686-693.
17. Leprince JG, Hadis M, Shortall AC, Ferracane JL, Devaux J, Leloup G, Palin WM. Photoinitiator type and applicability of exposure reciprocity law in filled and unfilled photoactive resins. *Dent Mater*, 2011; 27: 157-164.
18. Gonçalves F, Kawano Y, Braga RR. Contraction stress related to composite inorganic content. *Dent Mater*, 2010; 26: 704-709.
19. Santini A, Miletic V, Swift MD, Bradley M. Degree of conversion and microhardness of TPO-containing resin-based composites cured by polywave and monowave LED units. *J Dent*, 2012 ;40: 577-584.
20. Miletic V, Santini A. Micro-Raman spectroscopic analysis of the degree of conversion of composite resins containing different initiators cured by polywave or monowave LED units. *J Dent*, 2012; 40: 106-113.
21. Randolph LD, Palin WM, Bebelman S, Devaux J, Gallez B, Leloup G, Leprince JG. Ultra-fast light-curing resin composite with increased conversion and reduced monomer elution. *Dent Mater*, 2014; 30: 594-604.

22. Albuquerque PP, Moreira AD, Moraes RR, Cavalcante LM, Schneider LF. Color stability, conversion, water sorption and solubility of dental composites formulated with different photoinitiator systems. *J Dent*, 2013; 41: e67-e72.
23. Ribeiro BC, Boaventura JM, Brito-Gonçalves JD, Rastelli AN, Bagnato VS, Saad JR. Degree of conversion of nanofilled and microhybrid composite resins photo-activated by different generations of LEDs. *J Appl Oral Sci*, 2012; 20: 212-217.
24. Alshali RZ, Silikas N, Satterhwaite JD. Degree of conversion of bulk-fill compared to conventional resin-composites at two time intervals. *Dent Mater*, 2013; 29: e213-217.
25. Finan L, Palin WM, Moskwa N, McGinley EL, Fleming GJP. The influence of irradiation potential on the degree of conversion and mechanical properties of twobulk-fill flowable RBC base materials. *Dent Mater*, 2013;29: 906-912.
26. Ilie N, Kebler A, Durner J. Influence of various irradiation processes on the mechanical properties and polymerization kinetics of bulk-fill resin based composites. *J Dent*, 2013; 41: 695-702.
27. Yamasaki LC, De Vito Moraes AG, Barros M, Lewis S, Francci C, Stansbury JW, Pfeifer CS. Polymerization development of "low-shrink" resin composites: Reaction kinetics, polymerization stress and quality of network. *Dent Mater*, 2013; 29: e169-e179.
28. Widra HW, Cramer NB, Stansbury JW, Bowman CN. The reciprocity law concerning light dose relationships applied to BisGMA/TEGDMA photopolymers: Theoretical analysis and experimental characterization. *Dent Mater*, 2014; 30: 605-612.

29. Collares FM, Portella FF, Leitune VC, Samuel SM. Discrepancies in degree of conversion measurements by FTIR. *Braz Oral Res*, 2014; 28: 9-15.
30. Tsuda H, Arends J. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Adv Dent Res*, 1997; 11: 539-547.
31. Stuart, BH. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*, 1 ed., John Wiley and Sons, 2004.
32. dos Santos RL, de Sampaio GA, de Carvalho FG, Pithon MM, Guênes GM, Alves PM. Influence of Degree of Conversion on the Biocompatibility of Different Composites In Vivo. *J Adhes Dent*, 2014;16: 15-20.
33. Pfeifer CS, Ferracane JL, Sakaguchi RL, Braga RR. Photoinitiator content in restorative composites: Influence on degree of conversion, reaction kinetics, volumetric shrinkage and polymerization stress. *Am J Dent*, 2009; 22: 206- 210.
34. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular Toxicology of Substances Released from Resin-Based Dental Restorative Materials. *Int J MolSci*, 2009; 10: 3861-3899.
35. Furuse AY, Mondelli J, Watts DC. Network structures of Bis-GMA/TEGDMA resins differ in DC, shrinkage-strain, hardness and optical properties as a function of reducing agent. *Dent Mater*, 2011; 27: 497-506.
36. Yoshida K, Greener EH. Effects of two amine reducing agents on the degree of conversion and physical properties of an unfilled light-cured resin. *Dent Mater*, 1993; 9: 246-251.
37. Alonso RC, Correr GM, Cunha LG, Brandt WC, Puppim-Rontani RM, Correr Sobrinho L, et al. Photoinitiator concentration and modulated- photoactivation:

- Influence on polymerization characteristics of experimental-composites. J Dent Res. 2008; 87: Abstr. No. 1801.
38. Alonso RC, de Souza-Júnior EJ, Dressano D, de Araújo GA, Rodriguez JM, Hipólito VD, Anauate-Netto C, Puppim-Rontani RM, Sinhoreti MA. Effect of photoinitiator concentration on marginal and internal adaptation of experimental composite blends photocured by modulated methods. Eur J Dent, 2013;7: S1-8.
39. Gomes GM, Calixto AL, Santos FA, Gomes OM, D'Alpino PH, Gomes JC. Hardness of a bleaching-shade resin composite polymerized with different light-curing sources. Braz Oral Res, 2006; 20: 337-341.

Legends:

Figure 1 - Coefficient magnitudes of the relationship between DC values, obtained from multiple linear regression analysis.

Figure 2 – Surface graphic of DC values obtained from the three methodologies used in the study.

*Table 1 – Composition of the experimental composites used in the study (in wt%)**

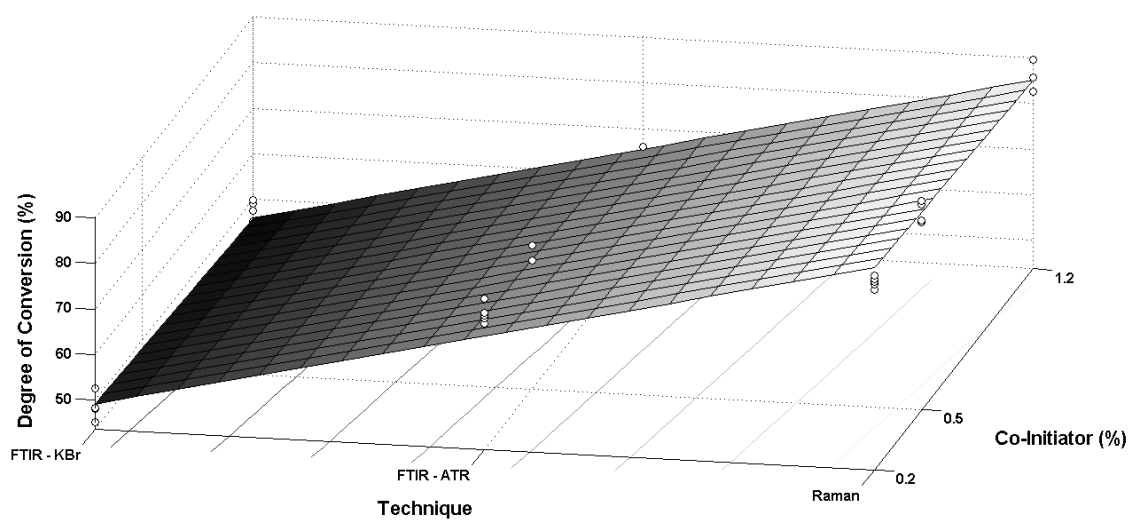
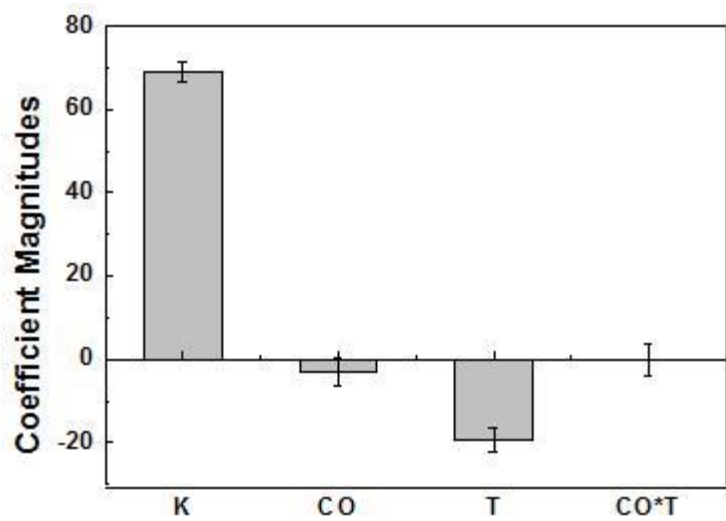
Composites		Organic Matrix (35%)	Filler content (65%)
Monomers		Photoinitiaton system (CQ/DMAEMA)*	
DMAEMA0.2	Bis-GMA (70%), TEGDMA (30%)	0.2/0.2%	silanated barium borosilicate glass
DMAEMA0.5		0.5/0.5%	
DMAEMA1.2		1.2/1.2%	

* the photoinitiator/amine ratio was kept constant at 1:1.

*Table 2- DC values (%) and standard deviation of each experimental composite and methodology employed**

Experimental composites	Raman spectroscopy	FT-IR ATR	FT-IR with KBr
DMAEMA0.2	84.93(1.21) A	73.44(2.10) B	48.42(2.66) C
DMAEMA0.5	87.06(2.42) A	71.27(4.29) B	43.87(2.49) C
DMAEMA1.2	85.95(3.48) A	62.74(4.03) B	47.90(2.06) C

* Different letters show statistically differences (Tukey's post-test, $p < 0.05$).



4.3 Redação da patente referente à resina composta com BZN, autorizada para depósito pelo Conselho Administrativo de Número 432/2014.

RESUMO

Co-iniciador inovador para resinas compostas com efeito antimicrobiano

O invento trata da inclusão do co-iniciador inovador 4,4`bis-dimetilaminobenzidrol com potencial antimicrobiano ao material restaurador dentário a base de resina composta, sem comprometimento das propriedades físico-mecânicas da mesma.

CAMPO DA INVENÇÃO

Corresponde a uma patente de inovação (PI), compreendida na seção A, subseção A61K (Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

As resinas compostas disponíveis no mercado, atualmente, são na sua maioria, resinas fotoativadas. Para tanto, moléculas fotoiniciadoras são incluídas nesses materiais, as quais têm a capacidade de absorver luz, e como resultado, gerar radicais livres que iniciam a polimerização desses materiais resinosos (Stansbury¹ 2000).

O sistema fotoiniciador mais comumente utilizado nas resinas compostas é o sistema canforoquinona/amina. A canforoquinona é um fotoiniciador que necessita de um co-iniciador para realizar o processo de polimerização efetivamente. As aminas terciárias (alifáticas ou aromáticas) não absorvem luz, mas interagem com a canforoquinona ativada para produzir espécies reativas (Jakubiak et al.² 2003, Jakubiak et al.³ 2007). Porém, esse sistema fotoiniciador possui algumas desvantagens, como tendência a promover uma coloração amarelada aos materiais resinosos (Schneider et al.⁴ 2008), aumentar a hidrofiliabilidade dos mesmos (Cadenaro et al.⁵ 2010), e causar corrosão dos substratos (Andrzejewska⁶ 2001). Inclusive, aminas aromáticas são suspeitas de possuir baixa biocompatibilidade com os tecidos orais (Liso et al.⁷ 1997, Vázquez et al.⁸ 1997, Achillias, Siderou⁹ 2004), podendo exibir característica mutagênica (Kucybala et al.¹⁰ 1996).

Sabe-se que fatores como tipo de fotoiniciador (Schneider et al.⁴ 2008; Schneider et al.¹¹ 2009, Costa Oliveira et al.¹² 2012), razão entre fotoiniciador/co-iniciador (Schneider et al.¹³ 2009, Musanje et al.¹⁴ 2009), tipo e concentração do co-iniciador (Schroeder et al.¹⁵ 2008, Leprince et al.¹⁶ 2011) podem influenciar as propriedades dos materiais resinosos. Essas propriedades compreendem desde a taxa de polimerização, o grau de conversão, o estresse de contração, a microdureza, como o comprometimento estético e a biocompatibilidade dos materiais.

Para determinados sistemas resinosos, uma maneira de se reduzir a toxicidade, aumentar a estabilidade de cor sem comprometer as propriedades físico-mecânicas dos polímeros com canforoquinona/amina é explorar novos substitutos para as aminas já utilizadas no mercado (Shi¹⁷ 2006, Wu¹⁸ 2007, Wang et al.¹⁹ 2009). Essas moléculas devem apresentar alta reatividade e promover alto grau de conversão do monômero, já que monômeros não reativos (residuais) podem se difundir para fora da matriz polimérica até a saliva na cavidade oral (Shi¹⁷ 2006).

Dentre os co-iniciadores pesquisados, uma amina terciária, desenvolvida por Vázquez et al.⁸ (1997) (DMOH - N,N-dimetilaminobenzil álcool) para utilização em cimentos ósseos, foi avaliada por Schroeder et al.¹⁵ (2008) com a proposta de ser um co-iniciador alternativo aos materiais resinosos à base de Bis-GMA e TEGDMA. Os autores encontraram resultados satisfatórios com o co-iniciador em questão, do qual se obtiveram alto grau de conversão da canforoquinona em concentrações menores de 0,25%. Nesse estudo, a efetividade do conjunto canforoquinona/DMOH, em termos de formação de radicais e conversão final dos monômeros foi maior que de canforoquinona/ DMAEMA (dimetilaminometil-metacrilato - co-iniciador comumente utilizado nos compósitos). Também, o co-iniciador 4,4'-bis-dimetilaminobenzidrol (BZN) foi estudado por de la Torre et al.²⁰ (2003) e de la Torre et al.²¹ (2007), para ser utilizado como amina substituta em cimentos ósseos. Esses compostos apresentavam ótimo desempenho quanto à biocompatibilidade, como baixa citotoxicidade e características antissépticas e antibacterianas. Porém, nenhum estudo utilizou o co-iniciador em resinas fotoativadas para uso dental.

Apesar de todos os esforços das empresas em garantir materiais com alta performance mecânica, pouco se preocupa com o fator biológico, mesmo frente a grande quantidade de estudos realizados com o propósito de desenvolver materiais antibacterianos e antifúngicos. Sabe-se que a superfície das resinas compostas

apresenta alto grau de susceptibilidade à colonização de microrganismos na cavidade oral, como fungos e bactérias, favorecendo microinfiltração bacteriana, recidiva de cárie e a consequente substituição da restauração. Todos esses fatores diminuem a vida útil das resinas compostas na cavidade oral.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O presente invento trata da inclusão do co-iniciador inovador 4,4`bis-dimetilaminobenzidrol com potencial antimicrobiano ao material restaurador dentário a base de resina composta, sem comprometimento das propriedades físico-mecânicas da mesma.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Tabela 1 mostra o grau de conversão em micro-Raman (em %) de cada grupo experimental.

A Tabela 2 mostra o grau de conversão em FT-IR (em %) de cada grupo experimental.

A Tabela 3 mostra a microdureza superficial (VHN) de cada grupo experimental.

A Tabela 4 mostra a resistência flexural (em MPa) de cada grupo experimental.

A Tabela 5 mostra a resistência à compressão (em MPa) de cada grupo experimental.

A Tabela 6 mostra o módulo de elasticidade (em GPa) de cada grupo experimental.

A Tabela 7 mostra a aderência *in vitro* de *Candida albicans* (UFC/mL x 10³) em cada grupo experimental.

A Tabela 8 mostra a aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* (UFC/mL x 10³) em cada grupo experimental.

A Tabela 9 e o Gráfico 1 mostram a viabilidade celular das células fibroblásticas 3T3 frente a cada grupo experimental.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Manipulação das resinas experimentais

A resina composta experimental seguiu a formulação a seguir: a matriz orgânica (25 a 35% em peso) foi composta de monômeros Bis-GMA (bisfenol A glicidil dimetacrilato) e TEGDMA (triétilenoglicol dimetacrilato). O agente iniciador utilizado foi a canforoquinona (CQ), e o inibidor hidroxitolueno butilado a 0,1% em peso (BHT). A matriz inorgânica foi composta de vidro de borossilicato de bário silanizado (tamanho médio de partícula: 0,7 μm – 65% a 75% em peso). Os co-iniciadores utilizados foram dimetilaminoetil-metacrilato (DMAEMA) e 4,4'-bis-dimetilaminobenzidrol (BZN), objeto de estudo do trabalho. Todos os compostos, com exceção do BZN, foram usados como recebidos pelos fabricantes. O BZN sofreu um processo de purificação. Misturou-se 10 g do BZN com 10 mL de acetona em um becker, e esse conjunto foi filtrado. Logo após, foi realizada a precipitação do composto, juntando-se 200 mL de água gelada com NaOH. Essa mistura foi levada em banho-maria para captação do BZN purificado.

A razão molar entre CQ/DMAEMA e CQ/BZN foi mantida constante em 1:1, variando-se as concentrações dos grupos experimentais. Os compósitos experimentais foram preparados em temperatura ambiente sob pouca iluminação, primeiro preparando-se separadamente a fase orgânica e a inorgânica, e posterior mistura de ambas as fases. Essa mistura foi homogeneizada em misturador de alta potência (DAC 150.1 FVZ, SpeedMixer, Flacteck, Landrum, SC, EUA) a 2400 rotações por minuto (rpm) por 1 min, para garantir mistura homogênea das fases. Em todas as metodologias a seguir, a distância da ponta fotopolimerizadora foi a mesma, para que existisse mesma densidade de energia incidindo sobre os espécimes.

O BZN purificado e o DMAEMA foram utilizados nas concentrações entre 0,2 e 1,2%, em peso.

Teste da microdureza superficial

Foram confeccionados 48 espécimes, sendo $n=8$ para cada grupo. A resina composta foi inserida em matrizes metálicas circulares, contendo uma cavidade de 5 mm de diâmetro por 2 mm de espessura. Essas matrizes foram dispostas sobre uma tira de poliéster e uma placa de vidro. Toda a cavidade da matriz foi preenchida em incremento único, com auxílio de uma espátula. Após a inserção do material, uma nova tira de poliéster foi disposta sobre os espécimes, e com leve pressão, uma placa de vidro foi posicionada acima do conjunto matriz/resina/tira de poliéster, para

que houvesse o extravasamento do material resinoso em excesso. A placa de vidro foi retirada e o espécime fotoativado com uma lâmpada de LED (Radii Plus, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália) por 20 s a uma potência de 1000 -1200 mW/cm², aferido com radiômetro. Após a polimerização, os espécimes foram armazenados em um recipiente à prova de luz e imersos em água destilada a 37°C, para aguardar a realização do teste de microdureza. O teste de microdureza Vickers (VHN) foi realizado em microdurômetro (Shimadzu, Kyoto, Japão). A superfície do espécime foi dividida em 4 quadrantes, onde foram realizadas 5 indentações com uma carga de 50g por 15 s cada.

Teste de resistência à compressão

Foram utilizadas matrizes de nylon (6x3 mm) para confecção de cilindros de resina composta, os quais foram levados a uma máquina de ensaios universal (Autograph AG-I, Shimadzu, Toquio, Japão) para serem submetidos ao teste de compressão. Esses espécimes foram fabricados da mesma forma como descrito para o teste de microdureza, e n=5 por condição experimental. Após a fotoativação com LED (Radii-Plus) por 20 s, os espécimes foram armazenados em um recipiente à prova de luz e imersos em água destilada a 37°C por 24 h. A carga utilizada foi de 10 KN numa velocidade de 1 mm/min, sobre angulação de 90°, até a falha do espécime, de acordo com a ISO 4049 (Adendo) e ANSI/ADA²². Foi obtida a tensão de ruptura da resina composta à compressão em MPa.

Teste de resistência flexural e módulo de elasticidade

Para realização desse teste, os espécimes foram confeccionados de acordo com as normas da ISO 4049 e ANSI/ADA n. 2722. O teste escolhido foi o de 3 pontos, e n=5 para cada condição experimental. Foram confeccionados espécimes retangulares, em matriz metálica bipartida de 25 X 2 X 2 mm, utilizando o mesmo protocolo acima descrito. A dimensão dos espécimes foi avaliada em paquímetro digital (Mitutoyo Corp., Tóquio, Japão), e então armazenados em água destilada a 37°C por 24 h, para realização do teste.

Os espécimes foram dispostos horizontalmente sobre os suportes de flexão da máquina de ensaios universal (Autograph AG-I, Shimadzu, Toquio, Japão). A porção móvel da máquina incidiu sob o braço fixo, atingindo perpendicularmente os espécimes em suas regiões centrais, até ocorrer a fratura. O teste foi realizado numa

velocidade de 0,5 mm/min. A carga máxima de fratura (em N) de cada espécime, foi mensurada, e a resistência flexural (RF) calculada em MPa, de acordo com a equação:

$$RF = 3FL/2bh^2$$

onde:

F: máxima carga exercida sobre o espécime, em N;

L: distância entre os suportes;

b: espessura do espécime;

h: altura do espécime.

Neste teste, foi possível verificar o módulo de elasticidade flexural da resina composta, expresso em GPa, de acordo com a equação:

$$ME = L^3 \Delta P / 4bh^3 \Delta d$$

onde:

L: distância entre os suportes;

h: altura do espécime;

b: espessura do espécime;

ΔP : Força máxima exercida no espécime;

Δd : deflexão máxima exercida no espécime.

Teste de grau de conversão (micro-Raman e FT-IR)

micro-Raman

A espectroscopia micro-Raman (modelo SENTERRA, Brucker Optics, Ettlingen, Alemanha) foi utilizada para avaliação do grau de conversão das resinas compostas experimentais. Realizaram-se duas mensurações da resina composta: fotopolimerizada e não-fotopolimerizada. Tomou-se o cuidado de se realizar as leituras em 24 h após a confecção dos espécimes, para que não houvesse diferença de tempo decorrido da polimerização entre os testes. O laser verde de 532 nm foi aplicado sobre a amostra, e o espalhamento detectado gerou o espectro Raman de interesse obtido pela relação entre a intensidade obtida para cada pico e o comprimento de onda do pico, dado em cm^{-1} . Cada espécime foi posicionado sobre o *stage*, no foco da objetiva (aumento de 20X). Foram realizadas 5 leituras (co-additions) por espécime, com tempo de integração de 40 s. A abertura confocal do laser (spot) foi 25 μm , sob potência de 20 mW. A região espectral de interesse foi 1785-875 cm^{-1} , e foram obtidos espectros a uma resolução de 4 cm^{-1} . Três

mensurações foram feitas em cada espécime, e uma média aritmética foi obtida para cada amostra (n=5). Foram investigadas as diferenças entre o pico $1,637\text{ cm}^{-1}$ (duplas ligações de carbono alifáticas reativas) e o pico $1,608\text{ cm}^{-1}$ (referência interna - duplas ligações de carbono aromáticas das moléculas de Bis-GMA). Obteve-se a razão das áreas encontradas em cada pico, tanto para a resina polimerizada como não polimerizada, de acordo com a equação:

$$GC = 1 - R_{\text{polímero}}/R_{\text{monômero}} \times 100$$

FT-IR

Nas mesmas condições supracitadas, após 24 horas pulverizou-se o centro dos corpos-de-prova, os quais foram mantidos na penumbra até o momento da análise em FT-IR (IR Prestige-21, Shimadzu, Tóquio, Japão). Um miligrama do pó gerado foi misturado com 100 mg de pó de sal de brometo de potássio (KBr). Essa mistura foi disposta dentro de um dispositivo para pastilhamento, e então esse conjunto foi comprimido numa prensa hidráulica (modelo SSP-10A, Shimadzu, Tóquio, Japão), com carga de 80 KN durante 3 min. Obtida a pastilha, a mesma foi posicionada dentro do suporte fixo do espectrômetro, acoplado no suporte para leitura. Também se realizou a análise das amostras não polimerizadas para o cálculo de grau de conversão. Os espectros de absorbância da resina polimerizada e não polimerizada foram analisados na região de $400\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ operando sobre as seguintes especificações: 64 scans e resolução de 4 cm^{-1} . O grau de conversão foi calculado da mesma forma como para micro-Raman.

Teste de citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade das resinas compostas experimentais, seguiu-se o protocolo ISO 10993-5 (Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing)²³. Foram confeccionados espécimes de todos os grupos, assim como realizado para os testes de microdureza, sendo n=4 para cada grupo experimental. O teste foi realizado em triplicata. Os espécimes de resina composta foram mantidos 24 h em água destilada estéril em estufa de CO_2 a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Decorrido esse período, os mesmos foram limpos em cuba ultrassônica por 30 minutos, seguindo a esterilização do espécime através da luz ultravioleta por 15 minutos cada lado, dentro do fluxo laminar. Em seguida foram colocados em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio DMEN (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)

suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), com 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina, mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 24 h. Decorrido esse período, 200 µL de cada extrato formado foi transferido em quadruplicata para placa de 96 poços já aderida 24 h com células fibroblásticas 3T3 1×10^5 céls/poço para avaliação citotóxica. Para controle positivo, utilizou-se poço apenas com meio suplementado com SFB a 10 % (Campanha et al.²⁴ 2006, Jorge et al.²⁵ 2004, Jorge et al.²⁶ 2006, Jorge et al.²⁷ 2007).

O cultivo dessas células foi realizado em frascos para cultura de células, incubados em estufa com 5% de CO₂ a temperatura de 37°C com umidade controlada (Campanha et al.²⁴ 2006, Jorge et al.²⁵ 2004, Jorge et al.²⁶ 2006, Jorge et al.²⁷ 2007). Para realização dos testes, uma suspensão de 1×10^5 células/poço de meio de cultura foi preparado. Para tanto, as células foram descoladas do fundo dos frascos por meio de um raspador de células. Essa suspensão foi disposta em tubos de 15 mL e centrifugada por 10 min a 1200 rpm, a fim de ocorrer a precipitação das células no fundo do tubo, formando o pellet. Desprezou-se o sobrenadante e 1 mL de meio foi suplementado para a contagem. Foram retirados 10 µL e misturados com 10 µL de corante azul de Tripán. Dessa solução, 10 µL foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburgo, Alemanha) onde as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio ótico (Nikon – modelo YS 100, Tóquio, Japão) num aumento de 400X.

Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de 1×10^5 células/poço para utilização no teste de citotoxicidade. Essa citotoxicidade foi analisada quantitativamente por meio da análise colorimétrica MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazoliumbromido). Nesta técnica, avaliou-se a atividade mitocondrial das células: o sal metiltetrazolium se incorpora à cultura de células; a enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal tetrazolium, produzindo cristais de formazan cor azul violeta; determinam-se assim valores relativos à intensidade da cor azul em espectrofotômetro específico com comprimento de onda de 570 nm (Leitor de Elisa Biotek EL 800, Biotek, Winooski, VT, EUA). Estabelece a relação de quanto maior a atividade mitocondrial, maior a intensidade da luz azul, e por sua vez, maior o número de células viáveis (Campanha et al.²⁴ 2006, Jorge et al.²⁵ 2004, Jorge et al.²⁶ 2006, Jorge et al.²⁷ 2007).

Avaliação in vitro da aderência de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* sobre as resinas compostas

Para esta avaliação, analisou-se a aderência de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* na resina experimental. Primeiramente, preparou-se caldo Sabouraud e 1,8 mL do caldo foram dispostos em 30 tubos de ensaio. Foram preparadas placas de Agar Sabouraud e BHI para semeadura de *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), respectivamente, para confirmação da pureza. Os corpos-de-prova foram confeccionados da mesma forma como para microdureza superficial (n=5). Após 24 h, realizou-se a desinfecção dos corpos-de-prova com álcool e luz ultravioleta, seguindo um protocolo previamente descrito na literatura (Wang et al.²⁸ 2014): 10 s imersos em álcool, 1 min de limpeza em gaze com álcool, novamente 10 s de imersão em álcool, e por fim, 2 h de esterilização em câmara de fluxo laminar (1 h para cada lado). Estes foram colocados dentro de tubos com 0,9 mL de meio e incubados por 24 h.

Procedeu-se o preparo de 10 mL da suspensão de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* (0,5 da escala McFarland – 1×10^8 células/mL, verificado em espectrofotômetro – 580 nm). Em cada tubo, já com os espécimes, foram pipetados 200 µL das suspensões com 1,8 mL de caldo Sabouraud e BHI, totalizando 2 mL em cada tubo. Esse conjunto ficou incubado por 72 h a 36°C. Decorrido esse período, os corpos-de-prova foram removidos dos tubos e lavados em solução salina por 20 s, para serem transferidos a tubos esterilizados onde adicionou-se 1 mL de solução salina. Agitou-se vigorosamente o tubo em Vortex por 1 min, para desprendimento das células aderidas. Esta foi considerada a solução pura, e a partir dela foram feitas diluições seriadas até 10^{-2} para *Candida albicans* e 10^{-1} para *Streptococcus mutans*. Dessas diluições, 100 µL foram semeados em agar Sabouraud e BHI, em duplicata para serem incubados por 48 e 72 h para *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, respectivamente a 36°C. Após esse período, as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foram contadas para verificação da aderência de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.

Resultados

A análise dos dados foi realizada por ANOVA 1 fator e pós-teste de Tukey, com $\alpha=0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

Para o grau de conversão (Tabela 1), resistência flexural (Tabela 4) e módulo de elasticidade (Tabela 6), não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Já para microdureza (Tabela 3), os grupos com BZN foram estatisticamente superiores aos grupos DMAEMA, independente da concentração. Para o grau de conversão em FT-IR, a resina com BZN0,5 mostrou resultados superiores aos controles (Tabela 2). No teste de resistência à compressão, o grupo BZN0,5 foi comparado ao seu controle DMAEMA0,5, sendo o grupo BZN0,2 diferente estatisticamente dos demais grupos (Tabela 5).

Já para o teste de aderência de *Candida albicans*, os grupos experimentais BZN foram estatisticamente superiores aos grupos controle DMAEMA (Tabela 7). A aderência de *Streptococcus mutans* mostrou melhores resultados para a resina com BZN0,5 (Tabela 8). Para o teste de citotoxicidade (Figura 9), os grupos se mostraram semelhantes ao controle positivo, independente do co-iniciador utilizado e da respectiva concentração, mostrando-se atóxicos frente às células fibroblásticas 3T3. Essa semelhança entre os grupos e o grupo controle positivo pode ser visualizada no Gráfico 1.

LIMITAÇÕES

Uma das limitações do composto BZN é a sua coloração escurecida, aspecto negativo quando se trata do uso de um material restaurador estético. Inclusive, a formulação com BZN a 1,2% não apresentou polimerização adequada, impedindo seu uso odontológico.

BENEFÍCIOS

A resina composta com o co-iniciador alternativo 4,4`bis-dimetilaminobenzidrol apresenta como peculiaridade o potencial antimicrobiano, fato que a destaca frente às resinas compostas disponíveis no mercado, as quais não possuem esse diferencial. Apesar dos grandes avanços realizados no tocante às propriedades mecânicas desses materiais, as empresas não tem como foco a obtenção de materiais restauradores dentários antimicrobianos e biocompatíveis. Um material com menor aderência microbiana e alta biocompatibilidade aumentaria a vida útil dessa restauração na cavidade bucal, além de garantir melhor higiene por

parte do paciente, já que existiria uma menor colonização microbiana sobre o material, tornando-se um grande atrativo às empresas odontológicas.

APLICAÇÕES

A resina composta com BZN apresenta indicações odontológicas, para uso em restaurações diretas.

REFERÊNCIAS

1. Stansbury JW. Curing dental resins and composites by photopolymerization. *J Esthet Dent*. 2000; 12(6):300-8.
2. Jakubiak J, Allonas X, Fouassier JP, Sionkowska A, Andrzejewska E, Linden LA, Rabek JF. Camphorquinone-amines photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization. *Polymer*. 2003; 44(18):5219-26.
3. Jakubiak J, Wrzyszczyński A, Linden LA, Rabek JF. The role of amines in the Camphorquinone photoinitiated polymerization of multifunctional monomer. *J Macromol Sci*. 2007; 44:239-42.
4. Schneider LFJ, Pfeifer CSC, Consani S, Prahl SA, Ferracane JL. Influence of photoinitiator type on the rate of polymerization, degree of conversion, hardness and yellowing of dental resin composites. *Dent Mater*. 2008; 24(9):1169-77.
5. Cadenaro M, Antoniolli F, Codan B, Agee K, Tay FR, Dorigo ES, Pashley DH, Breschi L. Influence of different initiators on the degree of conversion of experimental adhesive blends in relation to their hydrophilicity and solvent content. *Dent Mater*. 2010; 26(4):288-94.
6. Andrzejewska E. Photopolymerization kinetics of multifunctional monomers. *Prog Polym Sci*. 2001; 26(4):605-65.
7. Liso PA, Vazquez B, Rebuelta M, Hernández ML, Rotger R, San Roman J. Analysis of the leaching and toxicity of new amine activators for the curing of acrylic bone cements and composites. *Biomaterials*. 1997; 18(1):15–20.

8. Vázquez B, Elvira C, Levenfeld B, Pascual B, Goni I, Gurruchaga M, et al. Application of tertiary amines with reduced toxicity to the curing process of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res*. 1997; 34(1):129–36.
9. Achilias SD, Sideridou ID. Kinetics of the benzoyl peroxide/amine initiated free-radical polymerization of dental dimethacrylate monomers: experimental studies and mathematical modeling for TEGDMA and Bis-EMA. *Macromol*. 2004; 37(11):4254–65.
10. Kucybala Z, Pietrzak M, Paczkowski J. Kinetic studies of a new photoinitiator hybrid system based on Camphorquinone-N-phenylglycine derivatives for laser polymerization of dental restorative and stereolithographic (3D) formulations. *Polymer*. 1996; 37(20):4585-91.
11. Schneider LF, Consani S, Sakaguchi RL, Ferracane JL. Alternative photoinitiator system reduces the rate of stress development without compromising the final properties of the dental composite. *Dent Mater*. 2009; 25(5):566-72.
12. Costa Oliveira KM, Consani S, Gonçalves LS, Brandt WC, Cahuana-Vásquez RA. Photoelastic evaluation of the effect of composite formulation on polymerization shrinkage stress. *Braz Oral Res*. 2012; 26(3):202-8.
13. Schneider LF, Cavalcante LM, Consani S, Ferracane JL. Effect of co-initiator ratio on the polymer properties of experimental resin composites formulated with camphorquinone and phenyl-propanedione. *Dent Mater*. 2009; 25(3):369-75.
14. Musanje L, Ferracane JL, Sakaguchi RL. Determination of the optimal photoinitiator concentration in dental composites based on essential material properties. *Dent Mater*. 2009; 25(8):994-1000.
15. Schroeder WF, Cook WD, Vallo CI. Photopolymerization of N,N-dimethylaminobenzyl alcohol as amine co-initiator for light-cured dental resins. *Dent Mater*. 2008; 24(5):686-93.

16. Leprince JG, Hadis M, Shortall AC, Ferracane JL, Devaux J, Leloup G, Palin WM. Photoinitiator type and applicability of exposure reciprocity law in filled and unfilled photoactive resins. *Dent Mater*. 2011; 27(2):157-64.
17. Shi S, Nie J. A Natural Component as Coinitiator for Unfilled Dental Resin Composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; 82(1): 44-50.
18. Wu G, Nie J. Synthesis and evaluation of ethylene glycol 3-diethylamino-propionate methacrylate as a polymerizable amine coinitiator for dental application. *Dent Mater*. 2007; 23(5):623-9.
19. Wang K, Yang D, Xiao M, Chen X, Lu F, Nie J. Sesamin as a co-initiator for unfilled dental restorations. *Acta Biomater*. 2009; 5(7):2508-17.
20. de la Torre B, Fernández M, Vázquez B, Collía F, de Pedro JA, López-Bravo A, San Román J. Biocompatibility and Other Properties of Acrylic Bone Cements Prepared with Antiseptic Activators. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2003; 66(2):502–13.
21. de la Torre B, Salvado M, González Corchón MA, Vázquez B, Collía F, De Pedro JA, San Román J. Biological response of new activated acrylic bone cements with antiseptic properties. Histomorphometric analysis. *J Mater Sci: Mater Med*. 2007; 18(5):933–94.
22. American National Standard. American Dental Association Specification n. 27 for Resin-based filling materials; 1993.
23. International Standard ISO 10993-5. “Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing”; 1995.
24. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of hard chair-side reline resins: effect of microwave irradiation and water-bath post-polymerization treatments. *Int J Prosthodont*. 2006; 19(2):195-201.

25. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave post-polymerization heat treatments. *Int J Prosthodont*. 2004; 17(3):340-4.
26. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Paravina AC, Carlos IZ. Effect of the post-polymerization heat-treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(3):203-7.
27. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani AL, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerization cycle and post-polymerization treatments. *Gerodontology*. 2007; 24(1):52-7.
28. Wang S, Guo L, Seneviratne CJ, Huang B, Han J, Peng L, Liu X, Zhang C. Biofilm formation of salivary microbiota on dental restorative materials analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Dent Mater J*. 2014; 33(3):325-31.

REIVINDICAÇÕES

1. Resina composta com co-iniciador inovador com efeito antimicrobiano.
2. Resina composta com o co-iniciador antimicrobiano, conforme reivindicação 1, empregando o composto 4,4`bis-dimetilaminobenzidrol, e Bis-GMA/TEGDMA (25-35%) e carga inorgânica (65-75%), hidroxitolueno butilado (0,1%), em peso, para uso em restaurações diretas, com aplicação na área odontológica.
3. Resina composta formulada conforme reivindicação 1 e 2, na concentração entre 0,2 e 1,2 em porcentagem de peso de BZN.

Tabela 1

Concentrações			
Coiniciador	0,2	0,5	1,2
DMAEMA	84,9(1,2)A	86,7(4,9)A	85,4(7,5)A
BZN	86,9(0,9)A	83,2(1,7)A	X

Tabela 2

Concentrações			
Coiniciador	0,2	0,5	1,2
DMAEMA	47,3(1,5)A	43,8(2,4)A	47,9(2,1)A
BZN	64,3(18,9)A,B	74,3(8,7)B	

Tabela 3

Concentrações			
Coiniciador	0,2	0,5	1,2
DMAEMA	20,7(3,9)A	31,6(5,1)A	28,4(3,8)A
BZN	49,3(4,1)B	51,9(18,4)B	X

Tabela 4

Concentrações			
Coiniciador	0,2	0,5	1,2
DMAEMA	86,4(16,7)A	73,9(18,2)A	67,7(33,3)A
BZN	55,1(18,1)A	59,9(9,1)A	X

Tabela 5

Concentrações			
Coiniciador	0,2	0,5	1,2
DMAEMA	543,1(37,3)B	465,8(45,7)A,B	381,2(33,1)A
BZN	260,7(47,7)C	399,2(44,5)A	X

Tabela 6

Concentrações			
Coiniciador	0,2	0,5	1,2
DMAEMA	2,9(0,7)A	3,1(0,8)A	3,1(2,0)A
BZN	1,8(0,6)A	2,5(0,5)A	X

Tabela 7

Concentrações			
Coiniciador	0,2	0,5	1,2
DMAEMA	12,7(1,7)A	9,1(2,2)A,C	12,1(4,1)A
BZN	5,5(2,2)B,C	4,5(0,8)B	X

Tabela 8

Concentrações			
Coiniciador	0,2	0,5	1,2
DMAEMA	41,2(28,6)A	16,9(3,1)A,C	12,4(2,2)B,C
BZN	16,4(2,9)A,C	7,2(1,9)B,C	

Tabela 9

Concentrações			
Coiniciador	0,2	0,5	1,2
DMAEMA	1,14(0,08)A	1,21(0,15)A	1,21(0,09)A
BZN	1,26(0,03)A	1,37 (0,10)A	
Controle		1,18(0,09)A	

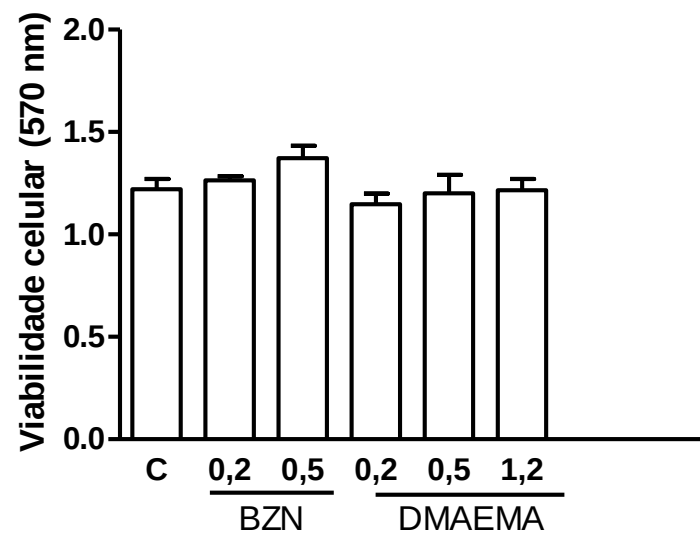


Gráfico 1

5 DISCUSSÃO

No primeiro artigo, pode-se constatar, por meio da revisão de literatura, que muito se tem pesquisado no âmbito de co-iniciadores e sistemas fotoiniciadores, na tentativa de garantir adequadas propriedades físico-mecânicas das resinas compostas, concomitantemente a uma significativa melhoria no tocante à biocompatibilidade desses materiais (Bakopoulou²⁹ 2009). A biocompatibilidade é uma característica imprescindível a um material dentário. Entretanto, ele deve se mostrar resistente frente à dinâmica encontrada no ambiente bucal, de forma a garantir propriedades como alta microdureza, resistência à compressão e flexural desse material (Thomaidis et al.³⁰ 2013).

Após a realização dos testes de grau de conversão dos espécimes do Experimento 1, verificou-se a necessidade de comparação dos resultados da literatura. Juntamente com os dados estudados no artigo de revisão de literatura, percebeu-se que as metodologias utilizadas para avaliação do grau de conversão são diversas, e dentre muitas, destacam-se o FT-IR e a espectroscopia Raman. Os dados obtidos por FT-IR com confecção de pastilhas de KBr foram mais baixos, comparados ao FT-IR com acessório de refletância (ATR), e ambos foram mais baixos que os valores obtidos com Raman. Estes resultados encontram respaldo na literatura, onde se encontraram valores entre 70 a 80% de grau de conversão com espectroscopia Raman (Miletic, Santini³¹ 2008, Miletic, Santini³² 2012), 50 a 60% para valores obtidos a partir do FT-IR com acessório (Albuquerque et al.³³ 2013, Kopperud et al.³⁴ 2013, Porto et al.³⁵ 2013, Collares et al.³⁶ 2014), e FT-IR com confecção de pastilhas de KBr os valores variam entre 40 a 60% (Gonçalves et al.³⁷ 2010; Ribeiro et al.³⁸ 2012). Dessa forma, os testes estatísticos verificaram que apesar de haver uma correlação forte e positiva entre os testes, não é possível realizar comparações de valores de grau de conversão entre as três metodologias estudadas.

O grau de conversão tem sido amplamente estudado graças a sua grande importância para os materiais resinosos, pois todos os componentes da resina, sejam orgânicos como os inorgânicos, influenciam a eficiência de polimerização do conjunto (Leprince et al.³⁹ 2013). Sabe-se que nenhum material à base de resina completa 100% de grau de conversão (Rueggeberg⁴⁰ 1999), porém, um alto valor percentual de grau de conversão é esperado, pois quanto maior a quantidade de

monômeros residuais na matriz orgânica, menos biocompatível será esse material (Urcan et al.⁴¹ 2010; Kopperud et al.³⁴ 2013; dos Santos et al.⁴² 2014). Uma pesquisa recente demonstrou que essa relação é diretamente proporcional, pois quanto maior o grau de conversão de uma resina composta, maior é a sua biocompatibilidade (dos Santos et al.⁴² 2014). Entretanto, cabe ressaltar que o grau de conversão analisa o número de ligações covalentes que ocorreram devido à quebra das ligações insaturadas. E nem sempre o monômero reage nas suas duas extremidades reativas. Desta forma, essa ligação dupla que não foi quebrada não é necessariamente um monômero residual, pois na outra extremidade houve a quebra da dupla ligação (Reis e Loguercio⁴³ 2009; Durner et al.⁴⁴ 2012).

Percebe-se então que grande parte dos constituintes das resinas compostas apresenta algum grau de toxicidade (Bakopoulou²⁹ 2009). Não só as aminas utilizadas como co-iniciadores, mas inclusive os monômeros formadores da matriz orgânica (Urcan et al.⁴¹ 2010). Assim, constata-se a necessidade de não somente incluir compostos biocompatíveis, mas também tornar os compostos já existentes aptos a reagir da maneira mais eficiente possível. Portanto, um co-iniciador capaz de gerar radicais livres numa quantidade suficiente para haver adequada quebra de duplas ligações dos monômeros e consequente formação de polímeros ainda é assunto questionável na literatura (Nie Bowman⁴⁵ 2002, Wu Nie⁴⁶ 2006, Liu et al.⁴⁷ 2007, Shi Nie⁴⁸ 2007, Wu, Nie⁴⁹ 2007, Schroeder et al.¹⁵ 2008, Wang et al.¹⁹ 2009, Musanje et al.⁵⁰ 2009, Schneider et al.¹¹ 2009, Shi et al.⁵¹ 2010, Leprince et al.¹⁶ 2011, Munchow et al.⁵² 2013). No presente estudo, os valores de grau de conversão em FT-IR do co-iniciador alternativo BZN foram satisfatórios, uma vez que os resultados foram superiores aos controles com o co-iniciador DMAEMA. Essa quantidade de radicais livres formadas denomina-se reatividade, e tem a ver com a estrutura das aminas (Bowen, Argentar⁵³ 1972). O que se espera de um co-iniciador é que ele forme grande quantidade de radicais livres juntamente com a canforoquinona, após atingir seu estado “excitatório”. Essa quantidade deve ser suficiente para promover a quebra das duplas ligações de carbono alifáticas dos monômeros (Stansbury¹ 2000). Nessa linha de raciocínio, espera-se que quanto maior a concentração de amina na resina composta, maior seria seu grau de conversão, e por sua vez, as propriedades físico-mecânicas da cadeia polimérica final. Porém, pesquisadores demonstram uma série de pontos negativos quando da incorporação de altas concentrações de aminas: baixa estética, devido a sua

coloração amarelada (Bowen, Argentar⁵³ 1972; Schneider et al.⁴ 2008); menor grau de conversão, comparado às concentrações menores – provavelmente devido à reação atingir um *plateau*: ocorre a terminação antes de haver uma quebra suficiente das cadeias insaturadas de carbono alifáticas (Yoshida, Greener⁵⁴ 1994; Musanje et al.¹⁴ 2009); e por fim, baixa biocompatibilidade – as aminas se mostram tóxicas em testes *in vivo* (Liso et al.⁷ 1997; Vázquez et al.⁸ 1997).

Um motivo plausível para o amplo uso do co-iniciador DMAEMA talvez seja a capacidade deste em copolimerizar-se com os monômeros para formar uma cadeia polimérica mais consistente (Yoshida, Greener⁵⁵ 1993), o que aumenta a biocompatibilidade do polímero final. Inclusive, Furuse et al.⁵⁶ (2011) avaliaram diferentes aminas comumente utilizadas em sistemas resinosos e concluíram que o DMAEMA apresentou os maiores valores de grau de conversão e as melhores propriedades ópticas.

Propriedades mecânicas como microdureza, resistência à compressão e flexural, módulo de elasticidade, predizem o comportamento desses materiais quando em função na cavidade bucal. No Experimento 1, as resinas compostas experimentais foram testadas em todas as suas características, pois o tipo e a concentração do co-iniciador (Schroeder et al.¹⁵ 2008; Leprince et al.⁵⁷ 2011) podem influenciar todas as propriedades listadas acima. Os resultados mostraram que em termos de microdureza, as resinas experimentais com BZN foram superiores aos controles DMAEMA, independente da concentração utilizada. Segundo a norma 27 da ADA²² para resinas compostas, os resultados do co-iniciador alternativo BZN mostraram-se satisfatórios, em termos de resistência à compressão e à flexão, em comparação ao tradicional sistema CQ/DMAEMA. Quanto à resistência à compressão, dentre as três concentrações, 0,5 foi a mais satisfatória para os grupos BZN, comparável ao seu controle DMAEMA 0,5. Para a resistência flexural, não houve diferença estatística entre os grupos, estando todos dentro dos padrões solicitados pela ADA²², os quais não devem ser inferiores a 50 MPa. Os valores de módulo de elasticidade encontrados se assemelham àqueles de resinas microparticuladas ou de baixa viscosidade, provavelmente pela quantidade de carga das resinas compostas experimentais (65% em peso) (Loguercio et al.⁵⁸ 2001; Braga et al.⁵⁹ 2003). Estima-se que um maior módulo de elasticidade poderia ter sido encontrado, caso a resina apresentasse 75% em peso de carga inorgânica, estando

próximo aos valores encontrados em resinas micro-híbridas, as quais são indicadas para restaurações universais (Reis e Loguercio,⁴³ 2009).

Apesar de todos os esforços das empresas em garantir materiais com alto desempenho mecânico, pouco se preocupa com o fator biológico, mesmo frente a grande quantidade de estudos realizados com o propósito de desenvolver materiais antibacterianos e antifúngicos. Uma revisão sistemática recente relatou existir uma quantidade significativa de materiais pesquisados com atividade antibiofilme (Wang et al.⁶⁰ 2014). A superfície das resinas compostas apresenta alto grau de susceptibilidade à colonização de microrganismos na cavidade oral, como fungos e bactérias, comparados a ormôceros e compômeros (Burguers et al.⁶¹ 2009). Sobre o teste de aderência microbiana, optou-se pelo uso de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* por serem dois microrganismos presentes na formação do biofilme, acidogênicos, acidúricos e patógenos altamente participantes na formação da cárie em esmalte e dentina (Pereira⁶² 2014). Inclusive, existem evidências científicas que comprovam o efeito sinérgico de ambos na patogenia da doença cárie (Pereira⁶² 2014).

Os resultados encontrados com *Candida albicans* mostraram uma redução significativa da aderência desses microrganismos às resinas compostas com BZN, em comparação aos controles com DMAEMA. Inclusive, as resinas com BZN também foram efetivas contra a aderência de *Streptococcus mutans*, mostrando ser um possível agente antibacteriano. Os achados estão de acordo com os encontrados por de la Torre et al.²⁰ 2003, os quais avaliaram a concentração inibitória mínima do BZN frente a 4 microrganismos, dentre eles, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (bactéria gram-positiva). Foram utilizadas diluições que provocassem 80% de redução em relação ao controle dimeti-para-toluidina (DMT). A atividade do BZN foi 8,04 vezes mais potente que o DMT, para ambos os microrganismos. Na Odontologia, esse co-iniciador é amplamente utilizado em resinas quimicamente ativadas.

Esse potencial antimicrobiano do BZN ocorre provavelmente devido à semelhança da sua estrutura molecular com o cristal violeta (de la Torre et al.²⁰ 2003). Em cada molécula, existem dois grupos anilina, que comprovam a semelhança química com o cristal violeta. Adams⁶³ (1967) verificou a ação

antibacteriana do cristal violeta contra *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *B. subtilis*. A ação do cristal violeta é devido à formação de um complexo não-ionizado. Bactérias gram-negativas como *E. coli* tem altos picos isoeletrônicos e contêm menos componentes acídicos comparados aos gram-positivos, que usualmente tem baixos pontos isoeletrônicos, o que faz com que o complexo seja mais resistente ao corante. Nesse estudo, *E. coli* mostrou ser mais resistente ao cristal violeta que os gram-positivos, pois ele é mais resistente a formar complexos não-ionizados com o corante (Adams⁶³ 1967). Sabe-se que *Streptococcus mutans*, utilizado no presente estudo, é uma bactéria gram-positiva, e provavelmente é menos resistente ao BZN, o que o torna mais susceptível à formação dos complexos não-ionizados com o referido composto.

Ainda, estudos de Wilson, Mia⁶⁴ 1993, Traboulsi et al.⁶⁵ 2008, Ying et al.⁶⁶ 2010 mostraram o efeito do cristal violeta contra *Candida albicans*. O mecanismo de ação do cristal violeta ocorre através da penetração celular, ligação com o DNA da célula e indução de permeabilidade, levando à desintegração da membrana mitocondrial e lise celular (Traboulsi et al.⁶⁵ 2008). Já Ying et al.⁶⁶ (2010) atribui a função antifúngica ao composto por ser capaz de reduzir a atividade das enzimas fosfolipase e proteinase, importantes fatores de virulência de *Candida albicans*. Essas enzimas auxiliam na destruição tecidual e causam danos à membrana celular do hospedeiro, que são constituídas de proteínas e lipídios (Kantarcioglu, Yücel,⁶⁷ 2002).

Um teste piloto prévio, realizado por halo de inibição, demonstrou não haver liberação do composto no meio Agar Sabouraud ou BHI, já que nenhum halo pode ser visualizado com *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, respectivamente. Essa observação nos leva a especular que o efeito do co-iniciador antimicrobiano se dará quando o microrganismo entrar em contato com a resina composta; em outras palavras, o efeito antimicrobiano foi obtido no teste de aderência sobre as resinas, e não por liberação do composto no meio.

É de interesse ressaltar inclusive, que nesse estudo foi avaliado o grau de toxicidade das resinas compostas frente às células fibroblásticas 3T3. Essa propriedade estima o grau de comprometimento das células pulpares e gengivais em contato com o material em questão. Na metodologia utilizada, avalia-se

especificamente o grau de atividade mitocondrial celular, por meio de espectrofotometria. Foi possível detectar alto grau de atividade nas células postas em contato com a resina experimental, considerando-os atóxicos, viáveis frente à cultura de fibroblastos 3T3. Resultados semelhantes foram obtidos por autores que pesquisaram o BZN na formulação de cimentos ósseos (de la Torre et al.²⁰ 2003; de la Torre et al.²¹ 2007). De la Torre et al.²⁰ 2003 obtiveram reduzidos valores de toxicidade e maiores valores de biocompatibilidade *in vivo* com o co-iniciador BZN em cimentos ósseos. Nesses artigos, foi possível observar que houve a formação de tecido conectivo próximo ao tecido ósseo, atribuído ao efeito não citotóxico do cimento nos tecidos adjacentes.

Os testes com a resina composta com o co-iniciador alternativo BZN a 1,2% não foram realizados, pois a mesma não sofreu polimerização. Provavelmente, a resina sofreu alterações na cinética de polimerização e grau de conversão decorrentes da menor quantidade de monômero viscoso TEGDMA (Amirouche-Koeichi et al.⁶⁸ 2009, de Godoy Froes-Salgado et al.⁶⁹ 2014), especificamente na fase de propagação, quando os monômeros tiveram pouca mobilidade dentro da cadeia polimérica, atingindo rapidamente a fase de terminação (Andrzejewska⁶ 2001). Bons resultados foram obtidos a partir das resinas experimentais com concentrações menores, e o composto em questão apresentava coloração escurecida, o que comprometia a estética da resina composta. Todas essas limitações justificam a não utilização do BZN em concentrações maiores que 0,5%.

Ressalta-se que este é um estudo preliminar e *in vitro* de uma resina composta experimental. Os resultados são promissores, em especial àqueles encontrados nos testes de aderência microbiana. Entretanto, esses resultados devem ser cuidadosamente interpretados, uma vez que num estudo laboratorial não existe a formação de película adquirida e saliva, a qual pode influenciar na adesão dos microrganismos à resina composta (Burguers et al.⁶¹ 2009). Não se podem fazer extrapolações clínicas nesse momento, e é iminente a necessidade de mais estudos *in vitro* e *in vivo* para respaldar nossos achados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos estudos, é possível concluir que:

- Muitas pesquisas *in vitro* analisam potenciais co-iniciadores substitutos às tradicionais aminas, os quais apresentam alta reatividade e conseqüentemente bons resultados físico-químico e mecânicos, e, principalmente, mais biocompatíveis.
- O co-iniciador alternativo BZN apresentou grau de conversão e propriedades mecânicas satisfatórias, além de ser considerado atóxico a fibroblastos 3T3. Ainda, a avaliação de aderência de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* revelou que as resinas com BZN apresentaram alto grau de inibição em diluição, comparado ao controle DMAEMA.
- O grau de conversão das resinas compostas com o co-iniciador DMAEMA em diferentes concentrações não apresentou diferenças; porém, as três metodologias estudadas apresentaram forte correlação positiva, e influenciam os valores obtidos na seqüência: micro-Raman > FT-IR ATR > FT-IR com KBr.

REFERÊNCIAS

1. Stansbury JW. Curing dental resins and composites by photopolymerization. *J Esthet Dent*. 2000; 12(6):300-8.
2. Jakubiak J, Allonas X, Fouassier JP, Sionkowska A, Andrzejewska E, Linden LA, Rabek JF. Camphorquinone-amines photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization. *Polymer*. 2003; 44(18):5219-26.
3. Jakubiak J, Wrzyszczyński A, Linden LA, Rabek JF. The role of amines in the Camphorquinone photoinitiated polymerization of multifunctional monomer. *J Macromol Sci*. 2007; 44:239-42.
4. Schneider LFJ, Pfeifer CSC, Consani S, Prah SA, Ferracane JL. Influence of photoinitiator type on the rate of polymerization, degree of conversion, hardness and yellowing of dental resin composites. *Dent Mater*. 2008; 24(9):1169-77.
5. Cadenaro M, Antonioli F, Codan B, Agee K, Tay FR, Dorigo ES, Pashley DH, Breschi L. Influence of different initiators on the degree of conversion of experimental adhesive blends in relation to their hydrophilicity and solvent content. *Dent Mater*. 2010; 26(4):288-94.
6. Andrzejewska E. Photopolymerization kinetics of multifunctional monomers. *Prog Polym Sci*. 2001; 26(4):605-65.
7. Liso PA, Vazquez B, Rebuelta M, Hernández ML, Rotger R, San Roman J. Analysis of the leaching and toxicity of new amine activators for the curing of acrylic bone cements and composites. *Biomaterials*. 1997; 18(1):15–20.
8. Vázquez B, Elvira C, Levenfeld B, Pascual B, Goni I, Gurruchaga M, et al. Application of tertiary amines with reduced toxicity to the curing process of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res*. 1997; 34(1):129–36.
9. Achilias SD, Sideridou ID. Kinetics of the benzoyl peroxide/amine initiated free-radical polymerization of dental dimethacrylate monomers: experimental studies and mathematical modeling for TEGDMA and Bis-EMA. *Macromol*. 2004; 37(11):4254–65.
10. Kucybala Z, Pietrzak M, Paczkowski J. Kinetic studies of a new photoinitiator hybrid system based on Camphorquinone-N-phenylglycine derivatives for laser polymerization of dental restorative and stereolithographic (3D) formulations. *Polymer*. 1996; 37(20):4585-91.

11. Schneider LF, Consani S, Sakaguchi RL, Ferracane JL. Alternative photoinitiator system reduces the rate of stress development without compromising the final properties of the dental composite. *Dent Mater.* 2009; 25(5):566-72.
12. Costa Oliveira KM, Consani S, Gonçalves LS, Brandt WC, CCahuana-Vásquez RA. Photoelastic evaluation of the effect of composite formulation on polymerization shrinkage stress. *Braz Oral Res.* 2012; 26(3):202-8.
13. Schneider LF, Cavalcante LM, Consani S, Ferracane JL. Effect of co-initiator ratio on the polymer properties of experimental resin composites formulated with camphorquinone and phenyl-propanedione. *Dent Mater.* 2009; 25(3):369-75.
14. Musanje L, Ferracane JL, Sakaguchi RL. Determination of the optimal photoinitiator concentration in dental composites based on essential material properties. *Dent Mater.* 2009; 25(8):994-1000.
15. Schroeder WF, Cook WD, Vallo CI. Photopolymerization of *N,N*-dimethylaminobenzyl alcohol as amine co-initiator for light-cured dental resins. *Dent Mater.* 2008; 24(5):686-93.
16. Leprince JG, Hadis M, Shortall AC, Ferracane JL, Devaux J, Leloup G, Palin WM. Photoinitiator type and applicability of exposure reciprocity law in filled and unfilled photoactive resins. *Dent Mater.* 2011; 27(2):157-64.
17. Shi S, Nie J. A Natural Component as Coinitiator for Unfilled Dental Resin Composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 82(1): 44-50.
18. Wu G, Nie J. Synthesis and evaluation of ethylene glycol 3-diethylamino-propionate methacrylate as a polymerizable amine coinitiator for dental application. *Dent Mater.* 2007; 23(5):623-9.
19. Wang K, Yang D, Xiao M, Chen X, Lu F, Nie J. Sesamin as a co-initiator for unfilled dental restorations. *Acta Biomater.* 2009; 5(7):2508-17.
20. de la Torre B, Fernández M, Vázquez B, Collía F, de Pedro JA, López-Bravo A, San Román J. Biocompatibility and Other Properties of Acrylic Bone Cements Prepared with Antiseptic Activators. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 2003; 66(2):502–13.
21. de la Torre B, Salvado M, González Corchón MA, Vázquez B, Collía F, De Pedro JA, San Román J. Biological response of new activated acrylic bone cements with antiseptic properties. Histomorphometric analysis. *J Mater Sci: Mater Med.* 2007; 18(5):933–94.

22. American National Standard. American Dental Association Specification n. 27 for Resin-based filling materials; 1993.
23. International Standard ISO 10993-5. "Biological Evaluation of Medical Devices Part 1: Evaluation and Testing"; 1995.
24. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of hard chair-side relined resins: effect of microwave irradiation and water-bath post-polymerization treatments. *Int J Prosthodont*. 2006; 19(2):195-201.
25. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave post-polymerization heat treatments. *Int J Prosthodont*. 2004; 17(3):340-4.
26. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of the post-polymerization heat-treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(3):203-7.
27. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani AL, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerization cycle and post-polymerization treatments. *Gerodontology*. 2007; 24(1):52-7.
28. Wang S, Guo L, Seneviratne CJ, Huang B, Han J, Peng L, Liu X, Zhang C. Biofilm formation of salivary microbiota on dental restorative materials analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Dent Mater J*. 2014; 33(3):325-31.
29. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular Toxicology of Substances Released from Resin-Based Dental Restorative Materials. *Int J Mol Sci*. 2009; 10(9):3861-99.
30. Thomaidis S, Kakaboura A, Mueller WD, Zinelis S. Mechanical properties of contemporary composite resins and their interrelations. *Dent Mater*. 2013; 29(8):e132-41.
31. Miletic VJ, Santini A. Remaining unreacted methacrylate groups in resin-based composite with respect to sample preparation and storing conditions using micro-Raman spectroscopy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008; 87(2):468-74.
32. Miletic V, Santini A. Micro-Raman spectroscopic analysis of the degree of conversion of composite resins containing different initiators cured by polywave or monowave LED units. *J Dent*. 2012; 40(2):106-13.

33. Albuquerque PP, Moreira AD, Moraes RR, Cavalcante LM, Schneider LF. Color stability, conversion, water sorption and solubility of dental composites formulated with different photoinitiator systems. *J Dent.* 2013; 41(Suppl 3):e67-72.
34. Kopperud HM, Johnsen GF, Lamolle S, Kleven IS, Wellendorf H, Haugen HJ. Effect of short LED lamp exposure on wear resistance, residual monomer and degree of conversion for Filtek Z250 and Tetric EvoCeram composites. *Dent Mater.* 2013; 29(8):824-34.
35. Porto ICCM, Aguiar FHB, Cunha Brandt W, Liporoni PCS. Mechanical and physical properties of silorane and methacrylate-based composites. *J Dent.* 2013; 41(8):732-9.
36. Collares FM, Portella FF, Leitune VCB, Samuel SMW. Discrepancies in degree of conversion measurements by FTIR. *Braz Oral Res.* 2014; 28(1):9-15.
37. Gonçalves F, Pfeifer CCS, Sansbury JW, Newman SM, Braga RR. Influence of matrix composition on polymerization stress development of experimental composites. *Dent Mater.* 2010; 26(7):697-703.
38. Ribeiro BCI, Boaventura JMC, Brito-Gonçalves J, Rastelli ANS, Bagnato VS, Saad JRC. Degree of conversion of nanofilled and microhybrid composite resins photo-activated by different generations of LEDs. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(2):212-7.
39. Leprince JG, Palin WM, Hadis MA, Devaux J, Leloup G. Progress in dimethacrylate-based dental composite technology and curing efficiency. *Dent Mater.* 2013; 29(2):139-56.
40. Rueggeberg F. Contemporary issues in photocuring. *Compend Contin Educ Dent Suppl.* 1999; 20(Suppl 5):S4-15.
41. Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomater.* 2010; 31(8):2010-4.
42. dos Santos RL, de Sampaio GA, de Carvalho FG, Pithon MM, Guênes GM, Alves PM. Influence of Degree of Conversion on the Biocompatibility of Different Composites In Vivo. *J Adhes Dent.* 2014; 16(1):15-20.
43. Reis A, Loguercio AD. *Materiais Dentários Diretos – dos Fundamentos à Aplicação Clínica.* 1a ed. São Paulo: Santos, 2009. 423p.
44. Durner J, Obermaier J, Draenert M, Ilie N. Correlation of the degree of conversion with the amount of elutable substances in nano-hybrid dental composites. *Dent Mater.* 2012; 28(11):1146-53.

45. Nie J, Bowman CN. Synthesis and photopolymerization of N,N'-dimethyl,-N,N'-di(methacryloxy ethyl) -1,6-hexanediamine as a polymerizable amine coinitorator for dental restorations. *Biomaterials*. 2002; 23(4):1221-6.
46. Wu G, Nie J. Synthesis and evaluation of N,N-dimethyl-N',N'-di[2-(methylacryloyl)-ethoxycarbnylethyl] propyldiamine as a coinitorator. *J Photochem Photobiol A: Chem*. 2006; 183(1–2):154-8.
47. Liu S, Shi S, Hou G, Nie J. Benzodioxole derivative as coinitorator for dental resin. *Acta Odontol Scand*. 2007; 65(6):313-8.
48. Shi S, Nie J. Investigation of 3,4-Methylenedioxybenzene Methoxyl Methacrylate as Coinitorator and Comonomer for Dental Application. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2007; 82B:487–93.
49. Wu G, Nie J. Synthesis and evaluation of ethylene glycol 3-diethylamino-propionate methacrylate as a polymerizable amine coinitorator for dental application. *Dent Mater*. 2007; 23(5):623-9.
50. Musanje L, Ferracane JL, Sakaguchi RL. Determination of the optimal photoinitiator concentration in dental composites based on essential material properties. *Dent Mater*. 2009; 25(8):994-1000.
51. Shi S, Xiao P, Wang K, Gong Y, Nie J. Influence of chemical structures of benzodioxole-based coinitorators on the properties of the unfilled dental resin. *Acta Biomater*. 2010; 6(8):3067-71.
52. Munchow EA, Valente LL, Peralta SL, Fernandez MR, Lima GS, Petzhold CL, Piva E, Ogliari FA. 1,3- Diethyl-2-thiobarbituric acid as an alternative coinitorator for acidic photopolymerizable dental materials. *J Biomed Mater Res Part B*. 2013; 10(1B):1217–21.
53. Bowen RL, Argentar H. Tertiary Aromatic Amine Accelerators with Molecular Weights Above 400. *J Dent Res*. 1972; 51(2):473-82.
54. Yoshida K, Greener EH. Effect of photoinitiator on degree of conversion of unfilled light-cured resin. *J Dent*. 1994; 22(5):296-9.
55. Yoshida K, Greener EH. Effects of two amine reducing agents on the degree of conversion and physical properties of an unfilled light-cured resin. *Dent Mater*. 1993; 9(4):246-51.

56. Furuse AY, Mondelli J, Watts DC. Network structures of Bis-GMA/TEGDMA resins differ in DC, shrinkage-strain, hardness and optical properties as a function of reducing agent. *Dent Mater.* 2011; 27(5):497-506.
57. Leprince JG, Hadis M, Shortall AC, Ferracane JL, Devaux J, Leloup G, Palin WM. Photoinitiator type and applicability of exposure reciprocity law in filled and unfilled photoactive resins. *Dent Mater.* 2011; 27(2):157-64.
58. Loguercio AD, Bauer JRO, Reis A, Poskus LT, Rodrigues Filho LE, Busato ALS. Avaliação de propriedades mecânicas de resinas compostas indicadas para dentes posteriores. *Ver Bras Odontol.* 2001;58(6):382-5.
59. Braga RR, Hilton TJ, Ferracane JL. Contraction stress of flowable composite materials and their efficacy as stress-relieving layers. *J Amer Dent Assoc.* 2003;134(6):721-8.
60. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dental materials with antibiofilm properties. *Dent Mater.* 2014; 30(2):e1-16.
61. Burgers R, Schneider-Brachert W, Rosentritt M, Handel G, Hahnel S. *Candida albicans* adhesion to composite resin materials. *Clin Oral Invest.* 2009; 13(3):293-9.
62. Pereira DFA. Estudo do potencial cariogênico de *Candida albicans* [Tese]. São José dos Campos: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2014.
63. Adams E. The antibacterial action of crystal violet. *J Pharm Pharmacol.* 1967; 19(12):821-6.
64. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(8):354-7.
65. Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(3):272-6.
66. Ying S, Qing S, Chunyang L. The effect of gentian violet on virulent properties of *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 2010;169(4):279-85.
67. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses.* 2002;45(5-6):160-5.

68. Amirouche-Korichi A, Mouzali M, Watts DC. Effects of monomer ratios and highly radiopaque fillers on degree of conversion and shrinkage-strain of dental resin composites. *Dent Mater.* 2009; 25(11):1411-8.
69. de Godoy Fróes-Salgado NR, Gajewski V, Ornaghi BP, Pfeifer CS, Meier MM, Xavier TA, Braga RR. Influence of the base and diluent monomer on network characteristics and mechanical properties of neat resin and composite materials. *Odontology.* 2014 Apr 12. [Epub ahead of print].