

## AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE DIFERENTES FOTOINICIADORES EM DUAS LINHAGENS CELULARES

JÚLIO CÂ<sup>1</sup>, LUIZ ALEXANDRE CHISINI<sup>2</sup>, BHÁRBARA MARINHO BARCELLOS<sup>3</sup>;  
FERNANDA BARBOSA LEAL<sup>4</sup>; CARINE WELTER MEEREIS CW<sup>5</sup>, MARCUS  
CRISTIAN MUNIZ CONDE<sup>6</sup>; RODRIGO VARELLA DE CARVALHO<sup>7</sup>; FABRÍCIO  
AULO OGLIARI<sup>8</sup>; FLÁVIO FERNANDO DEMARCO<sup>9</sup>

<sup>1</sup>UFPEL – Graduando em Odontologia – cajulio125@hotmail.com

<sup>2</sup>UFPEL – Graduando em Odontologia – luizalexandrechisini@hotmail.com

<sup>3</sup>UFPEL – Graduanda em Odontologia – bharbarambarcellos@hotmail.com

<sup>4</sup>UFPEL – Programa de Pós-Graduação em Odontologia –

<sup>5</sup>UFPEL – Programa de Pós-Graduação em Odontologia –

<sup>6</sup>UFPEL – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – marcusconde82@gmail.com

<sup>7</sup>UFPEL – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – rodrigo.varella@gmail.com

<sup>8</sup>UFPEL – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

<sup>9</sup>UFPEL – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – ffdemarco@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A descoberta e o desenvolvimento de tratamentos restauradores baseados na utilização de blendas monoméricas a base de metacrilatos – sistemas adesivos (SA) e resinas compostas (RC) – foi responsável por uma mudança de paradigma na prática odontológica. A partir de sua descoberta houve uma drástica alteração nos conceitos de preparo cavitário permitindo assim uma maior preservação da estrutura dentária sadia (Odontologia minimamente invasiva) e reforço da estrutura dental remanescente a partir da confecção de restaurações diretas (PETERS e MCLEAN, 2001). O sucesso clínico dessas restaurações diretas irá depender, dentre outros fatores, da efetividade e durabilidade da interface de união entre o sistema adesivo e o substrato dental (MARTINS et al., 2008). Para que isso ocorra, um SA deve produzir satisfatórios valores de resistência de união à dentina; possuir componentes que otimizem o processo de polimerização (sistemas de iniciação) entre os monômeros metacrilatos (MEEREI et al., 2014); ser biocompatível com o substrato onde serão inseridos. Nos SA, os monômeros metacrilatos são importantes componentes estruturais da zona de interdifusão entre monomero resinoso e fibras colágenas conhecida como camada híbrida (NAKABAYASHI et al., 1982). Já os sistemas de iniciação (SI) possuem a função primordial de iniciar a reação de polimerização de SAs e RCs (SILVEIRA DE ARAÚJO et al., 2006). Os SI são compostos por fotoiniciadores, moléculas fotosensíveis com capacidade de formar radicais livres a partir de sua ativação por energia externa (luz, calor ou microondas). Tais componentes possuem a função primordial de iniciar a reação de polimerização de blendas monoméricas (TAY et al., 2001). O SI mais utilizado nos materiais odontológicos se caracteriza por um sistema dual composto por canforoquinona (CQ) que é ativada por luz visível na faixa de absorção entre 450 e 500 nm (max=468 nm). A CQ requer um co-iniciador uma vez que uma a energia específica para excitação da CQ (468 nm) é insuficiente para clivar um iniciador de formação de radicais a base de carbono. Assim, uma amina terciária (EDAB) doa hidrogênio para iniciar o processo de polimerização (TAY et al., 2001). Entretanto, esse SI apresenta algumas desvantagens que devem ser observadas. A cor amarela intensa, característica da CQ, pode comprometer a utilização de determinados materiais para a execução de procedimentos restauradores estéticos (TAY et al., 2001). Além disso, CQ e EDAB apresentaram efeitos citotóxicos, tais como aumento na

quantidade de formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (ATSUMI et al., 2001), aumento nos níveis intracelulares de glutathiona (ENGELMANN et al., 2005), e alterações do DNA de células em cultivo (VOLK et al., 2009). Assim, alguns fotoativadores alternativos têm sido investigados como potenciais produtos para uso nas resinas à base de metacrilatos. Dentre esses produtos podemos citar o bisfenil (2, 4, 6 – trimetilbenzoil) – oxidofosfínico – BAPO; 1, 3 – benzodioxola – BDO; bisfenil (2, 4, 6 – trimetilbenzoil) – oxidofosfínico – TPO; difeniliodoniohexafluorofosfato – DPI (OGLIARI et al., 2007); álcool piperonílico – AP; 1,3-dietil-2-ácido tiobarbitúrico – TBA. Tais materiais já se mostram como alternativas promissoras para a substituição da CQ (OGLIARI et al., 2007; MEEREI et al., 2014). Dessa forma, é importante que esses materiais tenham a sua citotoxicidade determinada, já que alguns deles nunca foram avaliados quanto à sua resposta biológica. Portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de seis diferentes materiais candidatos à substituição do sistema CQ/EDAB.

## 2. METODOLOGIA

Fibroblastos de embriões de camundongos (3T3/NIH) e células normais do epitélio humano (Queratinócitos – HaCaT) foram cultivados em meio Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%. Uma garrafa de cultivo foi incubada em uma estufa de CO<sub>2</sub> com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando as células atingiram a subconfluência, foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) removendo os metabólitos celulares. Depois disso, foi usada tripsina por 6 minutos para destacar as células da garrafa, e para inativá-la foi usada uma mistura de meio DMEM e SFB de no mínimo o mesmo volume de tripsina. Em um tubo de 15 mL colocou-se o conteúdo da garrafa para então ser levado para centrifuga, por 5 minutos, sob a rotação de 1000 rpm, ocorrendo assim a precipitação do conteúdo celular no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado 5 mL de meio DMEM a 10% de SFB, após a homogeneização, foi retirado 20 µL para a contagem das células em Câmara de Neubauer. Após a contagem, foram semeadas 3T3 (2x10<sup>4</sup> células por poço) e HACAT (8x10<sup>4</sup> células por poço) em uma placa de 96 poços. Então, a placa foi levada a estufa por 24h para a adesão das células. Então, foi avaliada a citotoxicidade dos seguintes materiais: BAPO - bisfenil (2, 4, 6 – trimetilbenzoil) – oxidofosfínico; BDO - 1, 3 – benzodioxola; TPO - bisfenil (2, 4, 6 – trimetilbenzoil) – oxidofosfínico; DPI – difeniliodoniohexafluorofosfato; AP – álcool piperonílico e TBA - 1,3-dietil-2-ácido tiobarbitúrico. A distribuição dos grupos foi realizada de acordo com a Figura 1. Para cada monômero foram realizadas diluições fracionadas de 0,25, 2,5 e 25 mM. As soluções foram colocadas em contato com as células por 24h. Após, a citotoxicidade foi avaliada através de um teste colorimétrico (MTT 5 mg/mL de DMEM). O MTT ficou em contato com as células por 4 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Após 4 horas de incubação das células com a mistura a base de MTT na estufa de CO<sub>2</sub>, retirou-se o conteúdo dos poços e colocou-se 200 µL de DMSO em cada poço. O DMSO ficou em contato com as células por 15 minutos e em seguida a placa foi colocada por mais 5 minutos em um agitador (150 rpm). Por último, a placa foi levada ao espectrofotômetro e lida em um comprimento de onda de 540 nm para a obtenção da absorbância. Os resultados foram submetidos a análise estatística de ANOVA duas vias e teste complementar de Tukey (p<0,05).

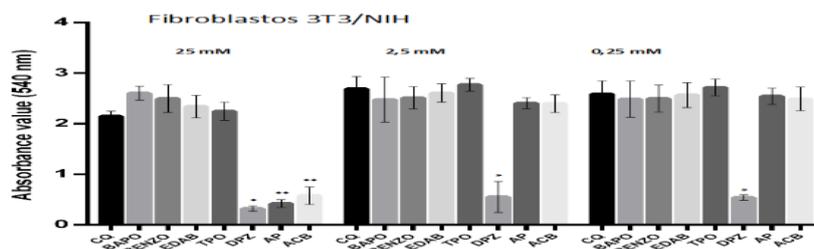


Figura 1. Citotoxicidade dos materiais avaliados em três concentrações ( 0,25, 2,5 e 25 mM) em uma linhagem fibroblastos de embriões de camundongos (3T3/NIH) em 24h de contato com as células. Número diferente de asteriscos indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

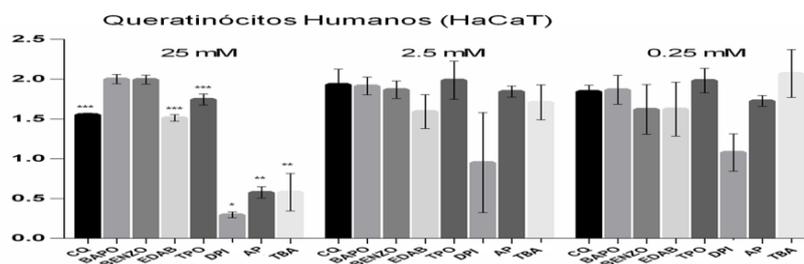


Figura 2. Citotoxicidade dos materiais avaliados em três concentrações ( 0,25, 2,5 e 25 mM) em uma linhagem de células normais do epitélio humano (queratinócitos – HaCaT) embriões de camundongos (3T3/NIH) em 24h de contato com as células. Número diferente de asteriscos indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a análise dos resultados foi possível observar que o fotoiniciador mais tóxico em todas as concentrações testadas e independente do tipo celular foi o DPI. Apesar disso, o DPI apresenta grandes vantagens como um iniciador alternativo; possui caráter iônico que proporciona hidrossolubilidade, o que é de grande interesse para a promoção da polimerização de monômeros polares em adesivos odontológicos, onde o fenômeno da separação de fase pode ocorrer (WANG et. al, 2006); proporciona um significativo aumento na taxa de polimerização (GOMEZ et. al, 2003) que é muito importante em sistemas que exigem uma rápida polimerização e proporciona um aumento do grau de conversão de resinas odontológicas (OGLIARI et. al, 2007) o que melhoraria as propriedades mecânicas do polímero. Baseado nessas características, os resultados do teste de citotoxicidade devem ser interpretados com cautela devido à sua limitação inerente. AP e TBA foram menos tóxicos que o DPI, porém mais tóxicos que CQ, BAPO, BDO, EDAB e TPO (Figura 2 e 3).

### 4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a maioria dos fotoiniciadores não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas. No entanto, DPI, AP e TBA apresentaram diferentes graus de citotoxicidade, sendo que o DPI foi o mais tóxico independente da concentração.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATSUMI, T; IWAKURA, I; FUJISAWA, S; UEHA, T; The production of reactive oxygen species by irradiated camphorquinone-related photosensitizers and their effect on cytotoxicity. **Arch Oral Biol**, v.46, n.5, p. 391–401, 2001.

ENGELMANN, J; VOLK, J; LEYHAUSEN, G; GEURTSSEN, W; ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 75, n. 2, p. 272-6, 2005.

VOLK, J; ZIEMANN, C; LEYHAUSEN, G; GEURTSSEN, W; Non-irradiated camphorquinone induces DNA damage in human gingival fibroblasts. **Dent Mater**, v. 25, n. 12, p. 1556-63, 2009.

DE MUNCK, J; VAN LANDUYT, K; PEUMANS, M; POITEVIN, A; LAMBRECHTS, P; BRAEM, M; VAN MEERBEEK, B; A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. **Journal of Dental Research**, v.84, n.2, p.118-132, 2005.

GOMEZ, ML; AVILA, V; MONTEJANO, HA; PREVITALI, CM; A mechanistic and laser flash photolysis investigation of acrylamide polymerization photoinitiated by the three component system safranin-1-triethanolamine/diphenyliodonium chloride. **Polymer**, v.44, p.2875-2881, 2003.

MARTINS, GC et al. Adesivos dentinários. **Rev. gaúcha Odontol**, v. 56, n.4, p. 429-436, out./dez 2008.

MEEREIS CTW et al. BAPO as an alternative photoinitiator for the radical polymerization of dental resins. **Dent Mater**, 2014.

NAKABAYASHI, N; KOJIMA, K; MASUHARA, E; The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **J Biomed Mater Res**. v.16, n.3, May 1982.

OGLIARI, FA; ELY, C; PETZHOLD, CL; DEMARCO, FF; PIVA, E; Onium salt improves the polymerization kinetics in an experimental dental adhesive resin. **Journal of Dentistry**, v.35, n.7, p.583-587, 2007.

Peters, MC; MCLEAN ME. Minimally invasive operative care. Minimal intervention and concepts for minimally invasive cavity preparations. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v.3, n.1, p.7-16, 2001

SILVEIRA DE ARAÚJO C, INCERTI DA SILVA T, OGLIARI FA, MEIRELES SS, PIVA E, DEMARCO FF. Microleakage of Seven Adhesives Systems in Enamel and Dentin. **Journal Of The Contemporary Dental Practice**, v.5, p.26-33, 2006.

TAY FR.; MOULDING KM.; PASHLEY DH. Distribution of nanofillers from a simplified-step adhesive in acid-conditioned dentin. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v.1, n.2, p.103-117, 1999.

WANG Y, SPENCER P, YAO X, YE Q. Effect of cointiator and water on the photoreactivity and photopolymerization of HEMA/camphorquinone-based reactant mixtures. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.78A, p.721-728, 2006.