

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Tese

**Caracterização de um novo material restaurador temporário
fotopolimerizável**

Sonia Luque Peralta

Pelotas, 2014

Sonia Luque Peralta

**Caracterização de um novo material restaurador temporário
fotopolimerizável**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Odontologia (área de concentração Materiais Odontológicos).

Orientador: Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Co-orientador: Prof. Dr. Evandro Piva

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P426c Peralta, Sonia Luque

Caracterização de um novo material restaurador temporário fotopolimerizável / Sonia Luque Peralta ; Rafael Guerra Lund, orientador ; Evandro Piva, coorientador. — Pelotas, 2014.

88 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Material temporário. 2. Metacrilato de zinco. 3. Propriedades mecânicas. 4. Antimicrobianos. 5. Biocompatibilidade. I. Lund, Rafael Guerra, orient. II. Piva, Evandro, coorient. III. Título.

Black : D151

Sonia Luque Peralta

Caracterização de um novo material restaurador temporário fotopolimerizável

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Área de concentração em Materiais Odontológicos) Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29/10/2014

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Orientador)
Doutor em Odontologia (Área de concentração Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Luiz Fernando Silveira
Doutor em Odontologia pela Universidade de Granada

.....
Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes
Doutor em Materiais Dentários pela Universidade Estadual de Campinas

.....
Prof. Dr. Josué Martos (Suplente)
Doutor em Odontologia pela Universidade de Granada

.....
Prof. Dr. Vicente Castelo Branco Leitune
Doutor em Odontologia (Área de Concentração Materiais Dentários) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho (Suplente externo)

Doutor em Odontologia (Área de concentração Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

.....

Prof. Dr. Giana da Silveira Lima

Doutor em Odontologia (Área de concentração Dentística) pela Universidade Federal de Pelotas

Banca examinadora:

.....

***Dedico este trabalho a Deus, pela vida e por
guiar meu caminho, a meus pais Regina e
Felipe pelo imensurável amor e contínuo
apoio, a meus irmãos Hubert e Herbert pelos
momentos de felicidade compartilhados ao
longo desses anos, por estarem sempre
presentes mesmo na distância, por acreditar
e me incentivar a ir atrás dos meus sonhos.***

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela dádiva divina da vida.

Ao meu Orientador Prof. Dr. **Rafael Guerra Lund**, pela confiança, ajuda, incentivo, paciência, por me colocar continuamente frente a inúmeros desafios que só me fizeram crescer, obrigada por acreditar em mim, às vezes mais do que eu mesma.

Ao meu Co-Orientador Prof. Dr. **Evandro Piva**, pelos ensinamentos, confiança, paciência, entusiasmo contagiante. Por ser exemplo a seguir pessoal e profissional...

Ao Prof. Dr **Fabricio Ogliari**, pela amizade, paciência, ensinamentos e ajuda na etapa de formulação.

Aos Professores, **Rafael Moraes, Fabio Leite, Adriana Fernandes da Silva, Adriana Etges**, sempre prontos a ajudar, discutir, sugerir. Obrigada por tudo!

A **Lisia Lorea, Hellen Oliveira, Cristina Isolan e Eliana Torre**, pela amizade, cumplicidade, por estarem sempre prontas para discutir resultados, ideias e experiências, por dividir os momentos alegres e os nem sempre bons, fazem parte da minha vida de forma insubstituível e permanente.

Aos **André Dutra, Sávio Bisinoto e Daniel Oliveira**, pela perseverança, determinação, pelos feriados e finais de semana no laboratório, por me ensinaram a ter paciência e tolerância. Vocês são mais que amigos, meus irmãos, muito obrigado pelo carinho e por se preocuparem comigo. Adoro vocês.

Aos alunos de iniciação científica **Juliana Ribeiro, Livia Schnaider, Gabriela Sehnem, Tharsis Rossato, Cristiane Reiznautt, Ewerton Kreps**, por compartilharem comigo momentos de aprendizado e superação, pela convivência. Vocês são especiais!

Aos queridos amigos que a pos-graduação proporcionou-me, **Silvia Fontes, Marilia Barbosa, Françoise Van de Sande, Caroline Ely, Gregori Boeira, Lisia Lorea, Laura Pintado, Eliana Torre, Carine Meireiss, Analise Montagner, Analice Rocha, Cristina Isolan, Hellen Oliveira** e meu querido **Eliseu Munchow**, obrigada pela troca de conhecimentos, pelos momentos que passamos juntos.

Ao secretário do PPGO, **Celeniro Junior**, sempre tão solícito e atencioso, obrigada!

Aos técnicos, **Tatiana Ramos** e **Carmen Lopes**, que auxiliaram na organização e resolução de qualquer necessidade adversa com entusiasmo e eficiência, nos diferentes laboratórios. Obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia/UFPeI, representado pelo Coordenador Professor Doutor **Maximiliano Cenci**, agradeço a oportunidade de fazer parte de uma equipe tão qualificada e autêntica.

A todo o pessoal que faz parte da Faculdade de Odontologia/UFPeI representado pela Diretora Professora **Márcia Bueno**.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CAPES PEC-PG**), pela concessão da bolsa de doutorado, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

PERALTA, Sonia Luque. **Caracterização de um novo material restaurador temporário fotopolimerizável**. 2014. 88f. Tese (Doutorado em Odontologia Área de concentração Materiais Odontológicos) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2014.

O objetivo deste estudo foi caracterizar um material restaurador provisório, avaliando: 1) as propriedades físico-mecânicas e biológicas de materiais restauradores provisórios fotopolimerizáveis comerciais e 2) experimentais contendo metacrilato de zinco. As marcas comerciais utilizadas foram: Bioplic (B), Fill Magic tempo(FM), Fermit-N(F), Luxatemp(L) e Revotek LC(R). Os materiais experimentais foram confeccionados com diferentes concentrações de metacrilato de zinco: 0% (controle), 0,5%, 1%, 2% e 5%p/p. Os testes mecânicos realizados foram: microinfiltração (ML), sorção(SW) e solubilidade(SL) em água, grau de conversão(DC) ou cinética de conversão, profundidade de polimerização(D), Resistência coesiva(UTS), dureza Shore D(SH). Os testes microbiológicos foram; teste de contato direto após 1h (TCD-1) e 24h (TCD-24), teste de acúmulo de biofilme de *S. mutans* (BT) e ensaio de citotoxicidade (EC). Os dados do estudo foram agrupados em: Parte 1 comparação entre marcas comerciais e Parte 2, avaliação de materiais experimentais com diferentes concentrações de metacrilato de zinco. Todos os dados foram tabulados e analisados no programa estatístico Sigma Stat versão 3.5. As comparações estatísticas foram realizadas ao nível de significância de 5%. O B apresentou maior SW, D e menor ML, TCD-1h. O R mostrou maiores valores para UTS, SH e menor SW/SL, e D. Para EC o L foi mais citotóxico. Nos materiais experimentais a incorporação de metacrilato de Zn não prejudicou as propriedades mecânicas nem a biocompatibilidade, e mostrou efeito antibacteriano no TCD-1h. Podemos concluir que a incorporação de metacrilato de zinco, melhorou algumas propriedades mecânicas e nas concentrações testadas não apresentou efeito antibacteriano esperado.

Palavras-chave: restauração dentária temporária; material restaurador provisório; propriedades físicas; antimicrobianos.

Abstract

PERALTA, Sonia Luque. **Characterization of the novel light-cured temporary filling material**. 2014. 88f. Tesis (Doctor Degree em Odontologia área de concentração em Materiais Odontológicos) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2014

The aim of this study was to characterization a provisional restorative material. The specific objectives were: 1) to evaluate the physic- mechanical and microbiological effect of commercial references; 2) evaluated the mechanical properties and microbiological effect after incorporation of zinc methacrylate in experimental materials. The commercial reference were used; Bioplic(B), Fill Magic Tempo (FM), Fermit-N (F), luxatemp (L) and Revotek LC (R). For the experimental materials were added different concentrations of zinc methacrylate; 0% (control), 0,5%, 1%, 2%, and 5%. The mechanical test were performed; microleakage (ML) water sorption and solubility (SW/SL) degree of conversion (DC) depth of cure (D),ultimate tensile strength (UTS), shore D hardness(SH). The microbiological tests were biofilm accumulation of *S. mutans* (BT), direct contact test after 1h (DCT-1) and 24 h (DCT-24), and cytotoxicity assay(CA). The findings of our study were grouped in: Part 1, comparisons among commercial references and Part 2, evaluation of experimental materials with different zinc methacrylate concentrations. All data were analyzed with Sigma Stat statistical program, version 3.5. Statistical comparisons were performed at a significance level of 5%. The B showed higher SW, D and lower ML and DCT-1h. The R presented higher UTS, SH; and lower SW/SL and D. The L was more cytotoxic than other group. Zinc methacrylate incorporated in experimental materials not affect the mechanical properties neither the biocompatibility and presented antibacterial effect in DCT-1h. Zinc methacrylate improved the main mechanical properties however no showed prolonged antibacterial effect in tested concentrations.

Key-words: temporary dental restoration; provisional restorative material; physical properties; antimicrobials

Lista de Figuras

Figura 1	Imagem do aparelho de Espectroscopia FTIR.....	24
Figura 2	Imagem do posicionamento de corpo de prova para metodologia de sorção e solubilidade.....	25
Figura 3	Imagem da disposição dos discos de material restaurador na placa de 24 poços.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1	Descrição de materiais utilizados no estudo.....	22
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA	Análise de Variância
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
BHI	<i>Broth Heart Infusion</i>
Bis-GMA	Bisfenol A Glicidil dimetacrilato
Bis-MEP	Bisfenol-Metacriloiloxietil hidrogênio fosfato
C6	Cadeia carbônica de 6 carbonos
CDC-Bio	Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais
CQ	Canforquinona
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDMAB	Etil 4-Dimetilamino Benzoato
F	Carga máxima em Newton
FO	Faculdade de Odontologia
GIC	Glass ionomer cement
GPa	GigaPascal
h	Hora
H	Altura
HEMA	2-Hidroxietil Metacrilato
ISO	<i>International Organization for Standardization,</i>
L	Distância

LMW	<i>Low Molecular Weigh</i>	
m ₁	Massa um ou primeira massa	
m ₂	Massa dois ou segunda massa	
m ₃	Massa três ou terceira massa	
MDP	<i>10-Methacryloyloxydecyl Phosphate</i>	
MDPB	<i>12-Methacryloyloxydodecyl pyridinium Bromide</i>	
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura	
min	Minutos	
mm	Milímetros	
MMPs	Metaloproteinases da matriz	
% mol	Percentual molar	
MPa	MegaPascal	
N	Newton	
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-bromide</i>	<i>diphenyltetrazolium</i>
°C	Graus Celsius	
pH	Potencial Hidrogeniônico	
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>	
PS	Peso Seco	
R	Radio	
R _p	<i>Rate of polymerization</i>	
R _p máx	Maximum rate of polymerization	
RPM	Rotação por minuto	

RT-FTIR	<i>Real Time–Fourier Transform Infra Red</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SFB/FBS	Soro Fetal Bovino
SiC	Carbeto de Silício
SL	Solubilidad
<i>S.mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TEGDMA	Trietilenoglicol Dimetacrilato
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
V	Volume
WS ou SA	<i>Water Sorption</i>
% wt	<i>Weight percent</i>
ZnSe	Seleneto de zinco
Mtbs	<i>Microtensile Bond Strength</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
2 PROJETO DE PESQUISA	21
2.1 JUSTIFICATIVA	21
2.2 OBJETIVOS	21
2.2.1 GERAL	21
2.2.2 ESPECÍFICOS	21
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
2.3.1 FORMULAÇÕES DO MATERIAL RESTAURADOR PROVISÓRIO EXPERIMENTAL	22
2.3.2 REFERÊNCIAS COMERCIAIS UTILIZADAS	22
2.3.3 ENSAIOS FÍSICOS-MECÂNICOS	23
2.3.3.1 Resistência a Flexão	23
2.3.3.2 Cinética e grau de conversão	24
2.3.3.3 Sorção e solubilidade em água.....	25
2.3.3.4 Alteração dimensional	27
2.3.3.5 Radiopacidade	27
2.3.3.6 Microinfiltração.....	28
2.3.4 ENSAIOS DE BIOCOMPATIBILIDADE	29
2.3.4.1. Ensaio de viabilidade celular / citotoxicidade	31
2.3.4.2. Ensaio de genotoxicidade	32
2.3.5. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	34
2.3.5.1 Acúmulo de biofilme de <i>S. mutans</i> nos materiais restauradores provisórios – Ensaio de Monocultura	34
2.3.5.2 Efeito antimicrobiano dos materiais restauradores provisórios - Modelo de microcosmos	36
2.3.5.3 Avaliação do acúmulo de biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
2.5 ORÇAMENTO	39
2.6 CRONOGRAMA.....	40
3 RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO	41
4 ARTIGO 1	42
5 ARTIGO 2.....	62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS	83

1 Introdução

O tratamento endodôntico nem sempre pode ser realizado em uma única sessão. Nestas situações, torna-se necessário o selamento da cavidade de acesso, por meio de um material restaurador provisório. Este material deve proporcionar o total isolamento entre a cavidade bucal e o canal radicular. A presença de infiltração marginal poderá contaminar a cavidade pulpar, alterar o efeito da medicação de demora, comprometendo assim, o sucesso da terapia endodôntica (NOGUERA et al., 1990; DEVEAUX et al., 1999; URANGA et al., 1999; KAMPFER et al., 2007). Além disso, a Endodontia não termina com a obturação do canal radicular; tão importante quanto o selamento da região apical é o selamento coronário para evitar a infiltração, sendo que diversos trabalhos demonstram que este pode comprometer todo o tratamento do canal (TORABINEJAD et al., 1990; SCHWARTZ & FRANSMAN, 2005).

Durante o processo de confecção de restaurações indiretas, também podem ser utilizados materiais restauradores provisórios. É importante que o dente preparado para receber uma restauração indireta seja protegido por uma restauração provisória, até a elaboração da restauração definitiva. Segundo Schillenburg et al. (1998), há várias formas de fornecer um revestimento protetor para os dentes, que vão desde os cimentos utilizados em pequenas cavidades até materiais capazes de recobri-los totalmente, com as resinas odontológicas. Usualmente, é empregada uma restauração provisória em resina acrílica que é cimentada ao preparo com cimentos provisórios, ou utilizado materiais resinosos provisórios que são aplicados diretamente ao preparo cavitário.

Para tanto, estabeleceram-se alguns requisitos básicos que o material provisório deve possuir, tais como: fácil manipulação e inserção na cavidade dental, tempo de presa rápido, não sofrer solubilidade e nem se desintegrar no meio bucal, não sofrer alteração dimensional e promover selamento marginal (DEVEAUX et al., 1992).

As restaurações provisórias também devem atender aos seguintes critérios:

1) proteção pulpar – a restauração deve ser feita de um material que minimize a

condutibilidade térmica e elétrica; 2) resistência ao desgaste o material - deve apresentar resistência à compressão e abrasão suficientes para manter o elemento dental em posição estável, não apresentando migração e mantendo adequada função oclusal; 3) lisura superficial – a restauração deve ter um contorno adequado e ser confeccionada com material que permita um bom acabamento e polimento, além de permitir sua limpeza durante o tempo que estiver em função na cavidade bucal, evitando-se o acúmulo do biofilme; 4) margens bem delimitadas - é importante que as restaurações provisórias não pressionem os tecidos gengivais. Os sobrecontornos podem criar saliências capazes de traumatizar a gengiva e favorecer a retenção do biofilme. Entretanto, uma restauração com subcontorno pode favorecer a proliferação do tecido gengival. Por último, o material também apresentar: 5) retenção; e 6) estética.

Há uma grande variedade de materiais restauradores provisórios disponíveis no mercado. Tal fato gera ao profissional dificuldade na escolha daquele que possua as características desejadas quanto ao selamento impermeável da cavidade. Além disso, estes materiais preenchem apenas alguns quesitos para realização de restaurações provisórias de maneira satisfatória, entretanto não há material ideal, ou seja, que possua todas as características desejáveis (KOAGEL et al. 2008).

O Bioplic[®] (Biodinamica, Londrina Brasil), por exemplo, sendo um material fotopolimerizável composto por Bis-GMA, dióxido de silício, grupos dimetacrilatos, carga orgânica e fotoativador, acrescenta vantagens na redução da porosidade e adaptação às margens cavitárias em uma restauração indireta. Além disso, apresenta como outra vantagem a facilidade de remoção do material restaurador, por meio de curetas de dentina, antes da restauração definitiva, não havendo necessidade do uso de brocas. No entanto, apresenta limitações como a ausência de radiopacidade em tomada radiográficas e microinfiltração.

Materiais como Cotosol[®] (Vigodent, Rio de Janeiro, Brazil) (composto basicamente de óxido de zinco, sulfato de zinco e sulfato de cálcio), Cavit[®] (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) e Tempore plus[®] (DFL Rio de Janeiro, Brasil) são materiais temporários prontos para uso. Chohayeb & Bassiouny (1985) citavam que os materiais prontos para uso poderiam ser superiores àqueles que requeressem espatulação, pois fatores na manipulação podem influir adversamente nas propriedades do material. O IRM[®] (Dentsply, Petrópolis, Brazil), por exemplo, requer

espatulação e é proporcionado e manipulado de acordo com as instruções do fabricante. Já os materiais prontos para uso reduzem esta variável de manipulação e tomam presa por hidratação e possuem alto grau de expansão linear, resultante da absorção de água. Esta expansão pode aumentar o contato entre o material e o acesso cavitário, aumentando o selamento (WIDERMAN et al., 1971).

Materiais seladores que apresentem praticidade na sua manipulação e facilidade de inserção, como os cimentos à base de óxido de zinco sem eugenol (Coltosol) e cimentos fotopolimerizáveis (Bioplic) têm despertado um grande interesse entre os cirurgiões-dentistas. Sob o ponto de vista clínico, o Coltosol e o Bioplic levam vantagem em relação ao IRM, por dispensarem a espatulação, tornando a sua aplicabilidade mais fácil, rápida e prática que o primeiro.

Os materiais restauradores fotopolimerizáveis tornaram-se uma alternativa atraente uma vez que apresentam melhor selamento marginal e menor sorção e solubilidade que os demais materiais restauradores (PIEPER et al., 2009; BITENCOURT et al., 2010). Por outro lado, algumas características precisam ser exploradas.

Além disso, um método para evitar a desmineralização do esmalte e o surgimento de lesões de cárie recorrentes tem sido o desenvolvimento de materiais restauradores resistentes à acumulação bacteriana. Com este propósito, vários agentes antimicrobianos vem sendo incorporados nos produtos dentários e aprovados para utilização intra-oral (MARCZUK-KOLADA et al., 2006; WIEGAND et al., 2007; SPENCER et al., 2009; HEHN et al. 2011). Tentativas para conseguir um material restaurador com efeitos antibacterianos são relevantes para a inibição do acúmulo de biofilme nas superfícies dos materiais e ao longo da interface entre a estrutura dentária remanescente e a restauração. Em nosso estudo, optou-se pela incorporação de metacrilato de zinco (MZ) na blenda de um material restaurador temporário, porque é um monômero que contém um grupo funcional metacrilato na sua estrutura que também é encontrado em outros monômeros presentes nos materiais restauradores adesivos, como o TEGDMA, o HEMA e o BISGMA. Assim é possível que o MZ copolimerize dentro de um material à base de metacrilatos. A utilização de um monômero copolimerizável com zinco na sua constituição é muito promissor, porque o zinco é um elemento químico metálico com forte ação antimicrobiana (NIU et al., 2010). Outra interessante propriedade deste íon metálico

é o seu efeito como inibidor de MMPs (DE SOUZA et al., 2000; SOUZA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SANTOS et al., 2004).

2 Projeto de Pesquisa

2.1 Justificativa

Existem poucos estudos na literatura sobre materiais restauradores provisórios fotopolimerizáveis e com potencial antimicrobiano. O presente trabalho pretende desenvolver um material experimental com similares ou melhores propriedades que os materiais já disponíveis no mercado odontológico. Dentre as principais características a serem alcançadas neste material restaurador experimental, estão: alcance de profundidade de polimerização de 5mm , facilidade na manipulação, radiopacidade, melhor vedamento e propriedades antimicrobianas.

2.2 Objetivos

2.2.1 Geral

Desenvolver um material restaurador provisório experimental fotopolimerizável, avaliando e comparando , o seu desempenho físico-mecânico, a sua biocompatibilidade e potencial antibacteriano com referências comerciais.

2.2.2 Específicos

- 1) Desenvolver a formulação para um material restaurador provisório experimental fotopolimerizável;
- 2) Avaliar o desempenho físico-mecânico do material restaurador provisório experimental através dos ensaios de: microinfiltração, resistência à flexão, grau e cinética de polimerização, sorção e solubilidade em água e radiopacidade;
- 3) Verificar a biocompatibilidade do material restaurador provisório experimental através de ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade, e;

4) Determinar Avaliar a atividade antibacteriana do material restaurador provisório experimental através de ensaios microbiológicos com modelos de biofilme.

A hipótese a ser testada é que o material restaurador provisório fotopolimerizável experimental apresentará propriedades físico-químico-mecânicas satisfatórias e será biocompatível, de maneira similar às outras marcas comerciais existentes no mercado, além de oferecer efeito antibacteriano.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Formulações do material restaurador provisório experimental

Os reagentes analíticos (Labsynth® Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil) empregados no presente estudo estão disponíveis no Centro de Controle e Desenvolvimento de Biomateriais (CDC-Bio) da Faculdade de Odontologia da UFPel . A proporção em massa dos produtos experimentais será realizada, isotermicamente a 23 °C e umidade relativa de 70%, em balança analítica de precisão (AG 200, Gehaka Indústria e Comércio Eletro Eletrônica, São Paulo, SP, Brasil).

Um co-monômero será obtido pela mistura dos monômeros dimetacrilato etoxilado de bisfenol-A glicidila (Bis-EMA8), dimetacrilato de uretano (UDMA) e dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), na razão 7:7:5:1 (m/m). O fotoiniciador canforoquinona (0,4%) e o co-iniciador benzoato de etila 4-dimetilamino (0,8%) serão adicionados para tornar o co-monômero fotoativável e adicionalmente serão acrescentados matriz inorgânica e metacrilato de zinco.

2.3.2 Referências comerciais utilizadas

Neste estudo, serão avaliados também materiais restauradores provisórios descritos na Tabela 1, os quais servirão de referências comerciais aos materiais experimentais.

Tabela 1 - Descrição de materiais utilizados no estudo.

Empresa	Produto	Composição
DFL	XTEMP LC	HEMA, uretano dimetacrilato, polietileno, oxido de ferro, canforoquinona, amina alifática terciária, ácido poliacrílico, sílica
Voco	CLIP/Caps	Uretano dimetacrilato (5-10%), DDDMA (5-10%), HEMA (5-10%), éster de acrilato (5-10%)
Biodinamica	BIOPLIC	Grupos dimetacrilato (40%), fibras orgânicas (18-25%), dióxido de silício, catalizador e fluoreto de sódio.
Centric INC Shelton/ USA	TEMPIT L/C	Uretano dimetacrilato (10-14%), HEMA (6-10%), carbomer 941 (40-45%)
Ivoclar Vivadent	SYSTEMP inlay/ onlay	dimetacrilatos de alto peso molecular, dióxido de silício altamente disperso, triclosan, catalizadores e estabilizadores
GC America inc USA	REVOTEK LC	Uretano dimetacrilato (40-50%), sílica cristalina quarta (20-30%)
3M ESPE	CAVIT LC	Uretano dimetacrilato, metacrilato adicionais, plastificante, estrôncio vidro, ácido silícico pirogenico, iniciadores, estabilizadores,
DMG	LUXATEMP	metacrilatos fluoretos funcionais, catalizadores, estabilizadores aditivos

2.3.3 Ensaios físicos-mecânicos

Os ensaios físico-mecânicos que serão realizados no presente trabalho serão executados no Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais (CDC-BIO) – FO/UFPel.

2.3.3.1 Resistência a Flexão

Espécimes (n=10) no formato de barras de 25×2×2mm, fotopolimerizados por 120s em cada lado, serão armazenados em água destilada a 37°C, por 24h, e submetidos ao teste de flexão por 3 pontos em máquina de ensaios mecânicos (DL500; EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil) à velocidade de 0,5 mm/min.

Serão registradas a resistência à flexão, módulo de flexão e trabalho de fratura dos materiais a partir da curva tensão × deformação.

2.3.3.2 Cinética e grau de conversão

A cinética de conversão dos cimentos será avaliada por meio de aparelho espectrofotômetro infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR Shimadzu Prestige21 Spectrometer, Shimadzu, Tóquio Japão) equipado com dispositivo de refletância total atenuada (ATR), composto por um cristal horizontal de seleneto de zinco (ZnSe), com espelhos de angulação de 45° (PIKE Technologies, EUA). Um suporte será acoplado para a fixação da unidade foto-ativadora LED (Radii® Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Austrália) ao espectrofotômetro (Figura 1), permitindo uma distância uniforme de 5mm entre a extremidade da ponteira de fibra ótica e a amostra. A irradiância será mensurada por intermédio de radiômetro portátil (model 100, Kerr, EUA).

Cada amostra será vertida diretamente no cristal de ZnSe em pequenas quantidades e fotoativada por 60 segundos. Cada cimento será analisado três vezes. Para o monitoramento de varredura será utilizado o software IRSolution, em uma faixa espectral entre 1750 e 1550cm⁻¹, com resolução de 8 cm⁻¹ e velocidade de deslocamento de espelho de 2,8mm/s. Com esta configuração, é possível obter um espectro por segundo durante a foto-ativação. A análise será realizada em ambiente com temperatura controlada de 23°C e umidade relativa de <60%.

O grau de conversão, por segundo, será calculado considerando a intensidade da vibração do tipo estiramento da dupla ligação carbono-carbono na frequência de 1635cm⁻¹.

O estiramento simétrico do anel aromático em 1610cm⁻¹ das amostras polimerizadas e não polimerizadas será utilizado como padrão interno. Posteriormente, os dados obtidos serão plotados em uma curva ajustada pelo parâmetro regressivo não-linear de Hill 3.



Figura 1 - Imagem do aparelho de Espectroscopia FTIR.

2.3.3.3 Sorção e solubilidade em água

Confecção dos espécimes

Todas as etapas do desenvolvimento desse estudo seguem a especificação ISO 4049 (2000). Após a formulação dos materiais testados, 10 espécimes serão confeccionados dispensando-se o material em um molde circular metálico com 1mm de espessura e 15mm de diâmetro. Sobre o material será colocada uma tira de poliéster e em seguida fotopolimerizado cada lado do corpo de prova em 9 posições diferentes durante 20s com uma unidade foto-ativadora LED (Radii® Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Austrália). Em seguida, todos os espécimes terão seus bordos polidos com lixas de granulação #600 e depois #1200.

Teste de Sorção e Solubilidade

A massa de dois corpos de prova de cada grupo avaliado será mensurada repetidamente até a sua estabilização. Os espécimes serão colocados em um “dessecador” contendo sílica e armazenados em estufa a 37°C. Depois disso, a massa de todos os demais espécimes também será mensurada. Essa massa será denominada de m_1 , pois representará a massa seca do espécime antes da ocorrência dos fenômenos de sorção e solubilidade.

Após a definição da m_1 , todos os espécimes de um mesmo grupo serão colocados dentro de um recipiente contendo água destilada, no volume de 10ml para cada corpo de prova presente. Os recipientes serão armazenados dentro de uma

estufa a 37°C e, após uma semana, a massa de todos os espécimes será mensurada novamente, e desta vez sendo denominada de m_2 , pois representará a massa úmida do espécime após este ter sorvido água do meio em que foi armazenado.

Em seguida, os corpos de prova serão armazenados novamente no “dessecador” com sílica, dentro de uma estufa a 37°C (fig. 2), a fim de uma terceira massa (m_3) ser adquirida, massa esta que representará a massa final do espécime após o fenômeno de lixiviação dos componentes do mesmo. Após a estabilização desta massa, a m_3 de cada corpo de prova será mensurada.

A Sorção de água (WS) e a Solubilidade (SL) serão calculadas a partir das seguintes fórmulas:

$$WS = (m_2 - m_3) / V, \quad SL = (m_1 - m_3) / V,$$

Onde V representará o Volume dos espécimes, que será obtido da seguinte maneira:

$$V = \pi R^2 h,$$

Onde π representa o valor constante de 3,14; R o raio do espécime; e h a altura do mesmo. O raio é obtido através da média entre dois diâmetros perpendiculares de cada espécime; e a altura será obtida pela média entre cinco alturas diferentes para cada um dos espécimes (MALACARNE et al., 2006).

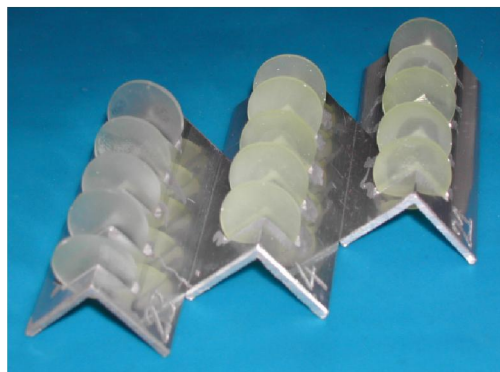


Figura 2 - Imagem do posicionamento de corpo de prova para metodologia de sorção e solubilidade.

2.3.3.4 Alteração dimensional

Para este teste, moldes bipartidos de silicone serão utilizados, possibilitando a obtenção de corpos de prova cilíndricos com dimensões de 12 mm de altura por 6 mm de diâmetro. Depois de manipulado, o material restaurador será colocado no interior do molde, formando um conjunto com lâminas de microscópio/lâminas de celofane em seu topo e sua base e, ao centro, o molde contendo o material. O preenchimento do molde será realizado com uma espátula Thompson[®] preenchendo toda a matriz. Em seguida, sobre a matriz será colocada outra lâmina de papel celofane e uma placa de vidro fazendo pressão, para plainar a superfície dos corpos de prova e extravasar os excessos do material. Depois disso, as placas de vidro serão removidas e os corpos de prova serão polimerizados por 60s. Os corpos de prova serão retirados das matrizes e os excessos do material serão eliminados com uma lâmina n° 15 montada em cabo de bisturi.

Após a confecção dos corpos de prova, suas dimensões serão aferidas com um paquímetro digital. A seguir, os corpos de prova serão armazenadas durante 30 dias em recipiente de vidro contendo 30 ml de água destilada/deionizada, em temperatura de 37 ° C. Após este período, o excesso de água das amostras será removido com o auxílio de papel absorvente e uma nova avaliação do comprimento será realizada.

2.3.3.5 Radiopacidade

Para a confecção das amostras, serão utilizados moldes metálicos bipartidos, com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de espessura. Para a obtenção das amostras, o molde será preenchido com o cimento e pressionado tanto na base como no topo com lâminas de vidro envoltas por papel celofane. Decorrido o tempo de endurecimento do cimento, as amostras, devidamente identificadas, serão colocadas sobre um filme oclusal. Sobre este filme também será colocada uma escada de alumínio 98%, com 50 mm x 20 mm e, espessura variando em forma de degrau a cada 0,5 mm (até 9 mm). Desta forma, é possível a comparação entre as diferentes espessuras da escada de alumínio e as amostras. Posteriormente, a

radiografia será obtida utilizando um aparelho de raios-X regulado para emitir radiação com 65 kV, utilizando 300 mm como distância foco-objeto. Após a revelação das radiografias, a densidade da imagem do espécime deve ser comparada com as densidades da escada de alumínio, utilizando um fotodensitômetro.

Para que o cimento desenvolvido satisfaça a especificação da ISO, a radiopacidade do material deve ser igual ou superior à radiopacidade de 3 mm de alumínio.

2.3.3.6 Microinfiltração

Serão utilizados dentes unirradiculares que apresentam as cavidades de acesso com paredes dentinárias. Os espécimes serão divididos nos diferentes grupos testados. Serão utilizados dez espécimes para cada material testado e dois grupos de três dentes cada, para os controles negativo e positivo. Após a limpeza da cavidade de acesso, se procederá com a impermeabilização da superfície dos dentes com duas camadas de esmalte para unhas com exceção de 2 mm da margem das cavidades de acesso. Em seguida, em cada câmara pulpar será colocada uma bolinha de algodão impregnada com dimetilglioxima, deixando-se 2 mm para os seladores provisórios em teste, todos manipulados conforme instruções dos fabricantes. Na etapa seguinte, os espécimes serão colocados em recipientes contendo solução de sulfato de níquel a 5%, a 37°C e mantidos assim por sete dias. Após esse tempo, que simulara o intervalo entre as sessões do tratamento endodôntico, os grupos serão retirados da solução e lavados em água corrente por 2 horas. A reação da solução de sulfato de níquel a 5% com a dimetilglioxima a 1%, presente nas bolinhas de algodão no interior da cavidade, forma o complexo Ni-dimetilglioxima de cor rosa, que evidenciará a infiltração através dos materiais seladores temporários. Para a leitura dos resultados, os dentes serão seccionados longitudinalmente com discos de aço, no sentido vestibulo-lingual, e fotografados com uma máquina digital. Será realizado a mensuração da área infiltrada nas coroas até a entrada dos canais com ajuda do software ImageTool, calibrando-se a ferramenta de medição com uma régua milimetrada fotografada ao lado de cada dente. As áreas infiltradas de cada metade do corte longitudinal das amostras serão obtidas em mm² e, depois, a média de infiltração ocorrida nos grupos.

2.3.4 Ensaios de biocompatibilidade

Os ensaios de biocompatibilidade serão desenvolvidos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de odontologia da UFPel.

Os materiais testados serão tanto os experimentais quanto os comerciais. Cada eludato dos materiais restauradores será diluído em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), em concentrações de 0,001 a 10 mM .

Cultivo celular

Para os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade dos diferentes materiais estudados, serão utilizado a linhagem celular de fibroblastos de camundongos L929 (de acordo com ISO 10993-5 Biological Evaluation of Medical devices-Part 5. Tests for in vitro cytotoxicity 2009)

Os fibroblastos de camundongos de uma linhagem imortalizada L929 provenientes do Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas (NCT-BIO/FOUFPel), serão utilizados para os experimentos.

O tubo de criogenia graduado de 4,5 ml (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) contendo a linhagem celular L929 será levado à temperatura de 37°C através da parcial imersão em banho-Maria (Biopar, Mod BM 03, Brasil) por 5 minutos e a seguir, dentro de capela de fluxo laminar vertical, o conteúdo será adicionado a uma garrafa de cultivo celular de área de superfície 25cm² (Techno Plastic Products), a qual já terá 5 ml de DMEM completo à temperatura de 37°C.

A garrafa de cultivo será colocada em estufa de 5% CO₂ à 37°C e permanecerá por um período de 3 horas para promover a adesão celular no fundo da mesma. Após este período, o meio de cultura contendo DMSO (protetor criogênico) será removido da garrafa com pipeta Pauster estéril acoplada à bomba a vácuo (AspiraMax Indústria de Aparelhos Médicos Ltda. Brasil). A pipeta será apoiada no fundo da garrafa na parede oposta a área de cultivo para a sucção do meio. Por fim, novo meio de cultura (DMEM, completo) será adicionado à linhagem celular e esta permanecerá em atmosfera úmida, à 37°C, até obter-se a confluência de aproximadamente 70% da superfície cultivável da garrafa.

Contagem Celular

Antes da realização dos experimentos de citotoxicidade e genotoxicidade, será determinado o número de células existentes nos frascos de cultivo. A finalidade dessa contagem é conhecer o número de células para uma divisão igualitária de células por grupo. O número de células semeadas em cada poço, para as L929 será de 2×10^4 para a citotoxicidade e 4×10^4 para a genotoxicidade.

Para a determinação do número (contagem celular), as células serão lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas do seu substrato utilizando 3ml de solução de tripsina-EDTA (Gibco/Invitrogen) para as garrafas de cultivo de 75cm^2 , por 5 minutos. Para neutralizar a ação da tripsina serão adicionados no mínimo a mesma quantidade de DMEM suplementado com 10% SFB e 1% antibiótico.

Após, o conteúdo total da garrafa utilizada no experimento será removido e colocado em um Falcon de 15ml. O volume de células será ressuspenso com uma pipeta volumétrica de 10ml para homogeneização das células no sobrenadante. De cada suspensão celular, 20 μ l serão dispensados em um tubo de criogenia.

Uma gota dessa mistura será colocada em um hematocítmetro (Labor Optik, Friedrichsdorf, Germany), e levado ao microscópio de fase invertido (modelo AAKER) para a realização da contagem. As células com aspecto brilhante e formato arredondado serão consideradas viáveis, enquanto as células escurecidas com formato distorcido serão consideradas mortas, não sendo contabilizadas na contagem dos 4 quadrantes das extremidades. O cálculo será realizado com base na fórmula onde o número total de células viáveis contadas nos 4 quadrantes externos será multiplicado por 10^4 (fator de correção do hematocítmetro). Esse valor será dividido pelo número de quadrados contados (nesse caso 4) e multiplicado pelo fator de diluição que é a quantia do meio de cultura adicionado. A partir dessa fórmula, obtaremos a quantidade aproximada de células presentes em cada garrafa.

O número total de células (NT) presentes no frasco será obtido através da equação abaixo, onde FD é o fator de diluição.

$$\text{NTcélis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total céls viáveis} \times \text{FD} \times 10^4}{4 (\text{n}^\circ \text{ quadrados contados})}$$

De acordo com a quantidade de células viáveis existentes, será calculado o número de células necessárias para o plaqueamento celular para a realização dos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade. Para a citotoxicidade, será necessário 2×10^4 céls/poço em 200 μ l e para a genotoxicidade, 4×10^4 céls/poço em 400 μ l. Uma nova equação matemática será realizada sob uma regra de três.

A suspensão de células será diluída de acordo com o número de poços usados. Na citotoxicidade, serão utilizadas placas de cultivo celular (ELISA, Techno Plastic Products) de 96 poços (96 x 200 μ l). Para a genotoxicidade, será utilizada uma placa de cultivo celular de 24 poços (Techno Plastic Products), Através desta regra de três, será obtida a quantidade da suspensão celular necessária para diluição em meio de cultivo para obtenção do volume necessário para cada experimento.

2.3.4.1. Ensaio de viabilidade celular / citotoxicidade

As condições de tratamento, incluindo cultura e tempo de exposições, serão baseadas nas especificações da ISO (International Standards Organization, 1997).

Os eludatos dos materiais testados serão utilizados em diferentes concentrações (puro 10^{-1} , 10^{-2}), e todos os procedimentos serão realizados em capela de fluxo laminar.

A suspensão das células será plaqueada em uma concentração de 2×10^4 células por poço e distribuídas em placas de cultivo celular (ELISA, Techno Plastic Products) de 96 poços. Cada poço receberá 200 μ l de DMEM suplementado com 10% SFB e 1% antibiótico. As placas serão incubadas à 37°C com 5% CO₂ (Thermo Electron Corporation) por 24 h (3T3/NIH) para promover a adesão celular.

Passado o tempo detalhado acima, serão retirados com 200 μ l do meio de cultura de cada poço e adicionados 200 μ l/poço das diferentes concentrações testadas (0,001 a 10mM) de cada material (FERNANDEZ et al., 2010). Nos poços controles, serão adicionados 200 μ l de DMEM com a mesma quantidade de células e seu meio de cultura, trocado após as primeiras 24 h (3T3/NIH). Poços preenchidos somente com DMEM serão usados como “brancos”.

Após 24 h, será realizada a remoção dos meios com os materiais-testes e adicionados 20 μ l de MTT (sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo) (Sigma/Aldrich) diluídos em 180 μ l de DMEM em cada poço (5 mg/ml MTT). As placas serão incubadas em ambiente sem luminosidade por

4 h à 37°C em atmosfera com 5% CO₂ (Thermo Electron Corporation). Após este período, a solução contendo MTT diluído em DMEM será aspirada e solubilizada com 200µl de Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo, Brasil) que será adicionados a cada poço.

As placas serão levadas a uma mesa agitadora (Biomixer, TS-2000A UDRL Shaker) a uma velocidade de 150 rpm por 10 minutos para a solubilização dos cristais de formazan produzidos pela redução do MTT pela desidrogenase succínica da respiração celular. Subsequentemente, a absorbância será medida usando um espectrofotômetro (Thermoplate, TP-Reader) em um comprimento de onda de 540nm.

2.3.4.2. Ensaio de genotoxicidade

O ensaio utilizado para a verificação da genotoxicidade dos materiais estudados será o teste de micronúcleos (MN) e a coloração pela técnica de Feulgen. O teste identifica estruturas contendo DNA dentro do citoplasma da célula, separadas do núcleo principal caracterizando algum dano genético celular. Em 1912, Robert Feulgen introduziu a técnica de coloração do DNA cromossômico com especificidade técnica denominada reação de Feulgen que permitiu a realização de inúmeros estudos de quantificação de DNA. A coloração com a Técnica de Feulgen consiste na pigmentação de todos os elementos celulares que contenham DNA, o qual, após hidrólise ácida moderada, quando tratado pelo reagente de Schiff, dá lugar à formação de um produto que cora num tom de vermelho arroxeado (KASTEN 2003).

Os ensaios de genotoxicidade serão executados sempre em capela de fluxo laminar e serão utilizadas somente as células 3T3/NIH.

As células serão semeadas em placas de 24 poços (Techno Plastic Products) sobre lamínulas de vidro circulares de 13mm (G13C Glasscyto), sobre as quais haverá adesão celular. Em seguida, será realizada a contagem celular e em cada poço serão adicionadas 4×10^4 células em 400µl de meio de cultura (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 1% de antibiótico.

As placas contendo as lamínulas e as células estarão em repouso em atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C (Thermo Electron Corporation). Neste ensaio, serão utilizadas células da linhagem permanente 3T3/NIH por 24 h. Depois deste período,

o meio será retirado dos poços com cuidado de não tocar nas lamínulas e, em seguida, serão adicionados 400µl/poço de cada material na concentração intermediária pré-estabelecida nos ensaios de citotoxicidade, onde houve viabilidade celular suficiente para o teste de MN.

Novamente as placas serão colocadas em estufa com 5% CO₂, à 37°C e, após 24 horas de contato com os materiais-teste, as lamínulas contendo as células serão lavadas com 1ml/poço de PBS por 10 segundos, O PBS será removido e as células serão fixadas e coradas com protocolo adaptado de Fernandez et al., (2010).

Fora da capela de fluxo laminar, as células nas lamínulas serão fixadas dentro dos próprios poços e adicionado 1ml/poço de solução contendo 3 partes de metanol (Vetec) para 1 parte de ácido acético (Synth). As placas serão então mantidas em freezer -20°C por 30 min e, passado este período, o metanol/ácido acético será removido dos poços e adicionado 1ml/poço de ácido clorídrico 1N (Synth) à temperatura ambiente por 1 minuto. Removido o ácido clorídrico, 1ml/poço de ácido clorídrico 1N pré-aquecido à temperatura de 63°C será adicionado novamente e as microplacas serão mantidas em estufa 60°C por 10 min. Após este período, a placa será resfriada à temperatura ambiente por 10 min e o ácido clorídrico será removido, sendo adicionado novamente o mesmo volume deste ácido por mais 5 min. Após, este ácido será removido novamente e adicionado 1ml/poço de água destilada por 10 min (2 passagens de 5 min, cada). A secagem das lamínulas será à temperatura ambiente e dentro da placa.

Serão adicionados a cada poço 1ml da solução de Schiff por 2 h 30 min, à temperatura ambiente, em local escuro e, logo após, o reagente será removido e as lamínulas cobertas por água tamponada (formulação) por 4 minutos, também em local sem luz. Passado este tempo, será realizada a lavagem em água destilada e as lamínulas removidas do interior dos poços, identificadas e armazenadas com cuidado para que sejam secas. Vinte e quatro horas após, as lamínulas serão imersas no corante Fast Green (Sigma-Aldrich) por 10 s e depois lavadas em 3 frascos de álcool metílico 96° (Vetec) por 3 s cada imersão. Depois disso, serão deixadas para secar por 24 h e posteriormente fixadas às lâminas histológicas identificadas por códigos aleatórios para que, durante a leitura, houvesse o cegamento dos examinadores.

Os micronúcleos serão visualizados em microscópio óptico comum com objetiva de 40x e oculares de 10x em lâminas identificadas, e a contagem será realizada por três examinadores cegos. A determinação da proporção de micronúcleos será realizada mediante a contagem manual de células micronucleadas em 1000 células por lâmina.

Os critérios utilizados para caracterizar a formação dos micronúcleos serão os seguintes: (a) devem ter um contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do citoplasma da célula; (b) apresentarem coloração semelhante ao núcleo principal; (c) seu diâmetro deve ser menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal; (d) devem estar no mesmo plano de foco do principal; (e) deve estar separado ou marginalmente justaposto ao núcleo principal, de modo que haja identificação clara do limite nuclear de ambos (COUNTRYMAN, HEDDLE, 1976).

2.3.5. Ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos serão desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Oral da Faculdade de Odontologia da UFPel.

2.3.5.1 Acúmulo de biofilme de *S. mutans* nos materiais restauradores provisórios – Ensaio de Monocultura

Reativação de cepas de *S. mutans* UA159

Cepas de *Streptococcus mutans* UA159 armazenadas a -80 °C serão reativadas, sendo transferidos 100µl do inóculo bacteriano para um tubo estéril contendo 9 ml de LMW + 1ml de glicose, e incubados por 18 h em estufa de CO₂. Após este período, 10µL da mistura serão transferidos para uma placa contendo ágar sangue e se realizará um *streak* do caldo no ágar. A placa será incubada por 24h em estufa de CO₂ e a partir do crescimento registrado na placa, serão coletadas colônias isoladas. Estas serão transferidas para um tubo estéril com 9 ml de LMW + 1ml de glicose(*starter*) e incubadas por 18 h em estufa de CO₂.

Teste de acúmulo de biofilme:

Antes de suspender os discos nas placas (Figura 3) será preparado o meio de cultura. 100ul de *starter* serão transferidos para um tubo contendo 40,5ml de meio LMW e 4,5ml de glicose. Esta mistura será homogeneizada e 2ml serão transferidos para cada poço da placa. Imediatamente após este procedimento, a placa com os discos será incubada em estufa de CO₂ por 24 h para que os microrganismos não sejam perturbados e ocorra a sua aderência inicial.

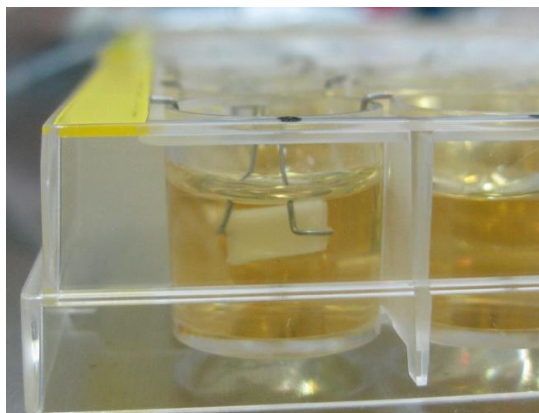


Figura 3 – Imagem da disposição dos discos de material restaurador na placa de 24 poços.

Após 24 h, os blocos serão lavados com solução salina e será trocado o meio. No LMW, será mensurado o pH e 1ml do meio será armazenado na geladeira para posterior análise de Ca⁺². O mesmo procedimento será realizado após 48h.

Coleta de biofilme: Após 72 horas, os blocos serão lavados com solução salina, e será coletado cuidadosamente o biofilme formado nos blocos. Para posterior análise de peso seco de cada diluição realizada, serão coletados 100ul e repicados em placas de petri contendo meio Agar BHI para análise de UFC (LI et al., 2009).

Determinação da viabilidade bacteriana de *S. mutans* nos biofilmes: Os blocos com biofilme formado em 72 h, expostos à solução de sacarose 1% *in vitro* serão transferidos para um eppendorf com 1 mL de solução de NaCl 0,9% (“salina”). Se realizará a sonicação por 30 s a 7 watts para dispensar todo o biofilme na solução salina e, a partir disso, serão realizadas diluições seriadas dos suspensos de biofilme, obtendo-se assim diluições de 10x (1), 100x (2), 1000x (3), 10000x (4), 100000x (5) e 1000000x (6). As amostras serão plaqueadas em meio ágar BHI,

onde serão colocadas 3 alíquotas (de 20 µL) de cada diluição. A numeração da placa corresponderá à diluição. As placas serão incubadas a 37°C, em ambiente de 10% de CO₂ por 24 h, simulando as condições orais de temperatura e pressão de CO₂. Após o período de incubação, será realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. mutans*. Para estimar as UFC será aplicada a seguinte fórmula:

$$[\text{UFC} \times 1000/20] \times \text{diluição}$$

Peso seco do biofilme; do mesmo eppendorf com suspenso de biofilme em solução salina, serão retirados 300 µL para outro eppendorf pré-pesado e codificado.

A solução será centrifugada por 5 min, 10000 g a 4°C. O sobrenadante será descartado e o tubo com o precipitado será levado ao dessecador por 24-48 h com pentóxido de fosforo. Será pesado novamente o eppendorf, o peso seco do biofilme em 1 mL será:

$$P \text{ seco final} = (P \text{ seco eppenforf} \times 1000) / 300$$

2.3.5.2 Efeito antimicrobiano dos materiais restauradores provisórios -Modelo de microcosmos

Coleta da saliva

Será realizada a coleta de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National CanTM, Chicago, Illinois, EUA) de um voluntário adulto e saudável (M.S.A.), que não esteja em terapia antibiótica por 1 mês. O doador suspenderá a higiene oral por 24h previamente às coletas, que serão realizadas no período matutino (em jejum). A saliva será depositada em um coletor graduado estéril e transportada em gelo ao Laboratório de Microbiologia (FO-UFPel). Uma alíquota de saliva (0,5mL) será separada para quantificação microbiana (UFC/mL). O restante será homogeneizado em agitador de tubos tipo Vortex e imediatamente utilizado como inóculo. Para cada experimento, a coleta de saliva será realizada no momento de sua utilização.

Protocolo de obtenção e crescimento dos biofilmes

A saliva será inoculada sobre discos dos materiais testados, em placas de 24 micro-poços, em um volume de 400µL por poço. Após 1h em repouso a 37°C, a saliva será delicadamente aspirada da base dos poços, e 1,8mL de meio DMM (com ou sem sacarose) serão adicionados em cada micro-poço. O modelo usado será de regime semi-dinâmico, e a adição de DMM com sacarose será efetuada em tempos de 6h e concentração de 1%. Após cada troca de meio as placas serão incubadas à temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após o período de desafio cariogênico, os discos serão enxaguados através de imersão em 2mL de solução salina estéril, inseridos em uma nova placa contendo DMM, e novamente incubados. Os biofilmes serão formados individualmente sobre os discos do cimento suspensos em dispositivos de fio ortodôntico, em cada micro-poço. As placas serão incubadas em condição atmosférica de anaerobiose (5-10% CO₂ e menos que 1% O₂) em jarras (Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda., Santa Cecília, SP) com geradores de anaerobiose (Anaerobac- Probac) mantidos em estufa a 37°C. Os meios, DMM com e sem adição de sacarose, serão renovados diariamente. Após cada renovação, será realizada a leitura de pH (pHmetro – Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP; eletrodo V621 – Analion, Ribeirão Preto, SP) do sobrenadante, individualmente em cada micro-poço (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Após 72h, os discos de esmalte serão removidos dos poços com pinça estéril e as bactérias não aderidas serão removidas gentilmente por lavagem em 2mL de solução salina estéril (THURNHEER et al., 2003). Os biofilmes serão removidos da superfície do disco com ajuda do sonicador.

2.3.5.3 Avaliação do acúmulo de biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Serão preparados discos dos materiais restauradores de acordo com as instruções dos fabricantes. Depois, os espécimes serão esterilizados com óxido de etileno e será realizado o condicionamento dos blocos com saliva, descrita no ensaio anterior. Após, 4, 8, 12 e 24h os blocos de cimento de cada grupo serão analisados no MEV (LI et al., 2009).

Preparo de amostras biológicas para MEV

Uma vez retirados do meio de cultura, os discos de cimento serão enxaguados com tampão fosfato-salino (PBS) duas vezes por um período de 5 min cada. Para a fixação das proteínas, será utilizado glutaraldeído 2,5% em PBS (solução 0,1 M em PBS, pH 7,4) durante 10 min. Após a fixação, serão enxaguados novamente em PBS duas vezes por 5 min cada um. Para fixação de lipídeos, será utilizado o tetróxido de ósmio a 1% em tampão clacodilato 0,05M (pH 6,8) por 60 min à temperatura ambiente, em uma capela de biossegurança. Depois da fixação, os espécimes serão lavados com PBS, duas vezes por 5 min cada um. Para desidratação das amostras, serão lavados duas vezes em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 80% e 100%) durante 5 min. Em seguida, as amostras permanecerão durante 1 h em ambiente limpo sobre papel-filtro, em temperatura ambiente para secagem. A secagem final será realizada em secador de ponto crítico ou dessecador. Finalmente, as amostras serão fixadas em “stubs” para sua posterior metalização (LI et al., 2009).

2.4 Análise estatística

O número de repetições em cada avaliação terá como base o cálculo amostral executado previamente a partir de um estudo piloto, adotando-se o poder de teste próximo ou superior a 80%, sendo empregado o programa SigmaStat® (Versão 3.01, Systat Software Inc., Port Richmond, CA, USA). A partir dos resultados, o método estatístico será escolhido com base na aderência ao modelo de distribuição normal e igualdade de variância. Para todos os testes será considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

2.5 Orçamento

Descrição	Custo unitário Rs	Custo total Rs
Bis-GMA	450,00	450,00
Bis-EMA	350,00	350,00
TEGDMA	210,00	210,00
PEG 400	180,00	180,00
Exotano 8	180,00	180,00
Referências comerciais	580,00	1160,00
Placas de cultura 24 poços	4.5	900,00
Fios ortodônticos	10,00	20,00
Caldo BHI	100.93	100.93
Meio Ágar BHI	155.05	155.05
Tryptona	91.95	91.95
Extrato de levedura	74.30	74.30
Phenylmethylsulfonyl Fluoride	373.10	373.10
Fosfato de potássio 500gr	52.40	52.40
Cloreto de potássio 500g	11.10	11.10
Tetróxido de ósmio 1g	1.075,00	1075,00
Cloreto de cálcio dihidratado 500g	28.50	28.5
Placas de cultura de 96 poços	4.5	45,00
Lixas para desgaste	1,00	100,00
Luvas para procedimento	18,00	36,00
Máscaras	10,00	10,00
Resina epóxica	100,00	100,00
Cola cianocrilato	40,00	40,00
Eppendorfs	28,00	84,00
Hacks	12,50	125,00
Microbrush	14,00	56,00
Despesas com impressão	400,00	400,00
Gastos com apresentação em congressos	2.000,00	2000,00
TOTAL		8408,33

3 Relatório do trabalho de campo

No presente trabalho, foram realizadas algumas mudanças: materiais descritos no projeto não foram possíveis adquirir, porque a venda de algum deles não está liberada no Brasil. Adequações na metodologia de microinfiltração. Dada à característica flexível do material, não foi possível realizar o ensaio de resistência à flexão. Foram acrescentados os testes de resistência coesiva, a caracterização da profundidade de polimerização e o ensaio de dureza Shore escala D. Decidiu-se por não incluir materiais radiopacos, tendo em vista a manutenção da máxima profundidade de polimerização possível para esse material, considerando o tipo de aplicação e requisitos necessários. O ensaio de microcosmos, anteriormente previsto no projeto, foi substituído pelo ensaio antimicrobiano de teste de contato direto, nos períodos de exposição de 1h e 24h. Porém o a avaliação do MEV não foi necessária porque não foi realizado o ensaio de biofilme. O teste de genotoxicidade não foi realizado devido as inúmeras metodologias incluídas no trabalho.

Além disso, o presente trabalho está apresentado de acordo com o nível de descrição em artigos previsto no Manual de Normas para Teses, Dissertações e Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal de Pelotas aprovado pelo COCEPE (2013). O referido manual está disponível no seguinte endereço eletrônico: http://prg.ufpel.edu.br/sisbi/Manual_Normas_UFPel_trabalhos_acadêmicos.pdf. Os artigos foram estruturados segundo as normas dos periódicos ao qual serão submetidos após as correções finais pela banca examinadora.

4 Artigo 1¹

Evaluation of Physical-mechanical properties and antibacterial effect of composite-based filling temporary materials

Sonia Luque Peralta*, Sávio Bisisnoto de Leles[†], André Lindemann Dutra[†], Adriana Fernandes da Silva[†], Evandro Piva*, Rafael Guerra Lund*[†]

* Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

[†] Laboratory of Oral Microbiology, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Postal address

* Corresponding author. Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas. Rua Gonçalves Chaves, 457, Pelotas, RS, Brazil. CEP: 96015-560. Tel/Fax: +55-53-3222-6690.

¹ Este trabalho esta formatado segundo as normas da periodico *Journal of Endodontic*, disponível <http://www.aae.org/publications-and-research/journal-of-endodontics/authors-and-reviewers/guidelines-for-publishing-papers-in-the-joe.aspx> (11/04/2014)

Abstract

The aim of this study was to compare selective physical-mechanical properties and antibacterial effect of five temporary restorative materials (TRM): Bioplic (B), Fill Magic Tempo (FM), Fermit inlay (F), Luxatemp LC (L), and Revotek LC (R). The physical-mechanical properties were evaluated by the determination of microleakage(MI), ultimate tensile strength(UTS), and Shore D hardness (HSD). In addition rate of polimerization(Rp^{-1}), depth of cure(DC), water sorption and solubility(WS/SL) were evaluated. The antimicrobial effect of the tested materials were assessed by *Streptococcus mutans*' biofilm accumulation (BT) and the direct contact test (DCT) using *Enterococcus faecalis* under 1 and 24h of exposure, and, the cytotoxicity by MTT assay. Data were analyzed by ANOVA or Kruskal Wallis followed by complementary post-hoc method ($p<0.05$). B, followed by FM and GIC had significantly lower percentages of microleakage in comparison to the other groups, FM and L showed the highest WS, while R and FM significantly showed the lowest SL values ($p<0.05$). The group R showed statistically the highest UTS mean and the lowest DC mean among groups. The group F showed the lowest Biofilm accumulation of *S. mutans* ($p=0.023$). Only the group L showed continued effect against *E. faecalis* after 1h and 24h in DCT. The present findings suggest the antibacterial effect of temporary materials Fill magic and Bioplic against *mutans* while Luxatemp showed inhibition of the accumulation of *S. mutans* biofilm and the growth of *E. faecalis* *in vitro*.

Keywords: temporary filling material, microleakage, water sorption and solubility, contact direct test, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*,

Introduction

Temporary restorative materials or temporary filling materials are commonly used to seal the access cavity between visits and after completion of endodontic therapy to prevent coronal microleakage. The most important function of the temporary filling materials during and after endodontic treatment is their sealing ability and prevention of microleakage (1). In spite of use of intracanal dressing between appointments of endodontic therapy, some studies reported presence of residual intracanal microorganisms after this procedure (2). Temporary filling materials with good sealing ability and bactericidal properties may be advantageous in preventing bacterial invasion after the endodontic treatment. These materials can be divided into different groups according to their composition: reinforced zinc oxide–eugenol-based materials, calcium sulfate-based materials, composite resin-based materials, resin-modified glass-ionomer materials, and traditional glass-ionomer materials (3, 4). Generally, all these materials are adequate if placed in a thickness of 3mm or greater(5).

Recently, new resin-based restoration materials were introduced as temporary restorative materials (6, 7). These materials contain monomer, initiator system, fillers and additives. Resin-based temporary materials must be bonded to provide an effective seal, because they undergo polymerization shrinkage of 1 to 3% (8, 9). This contraction is compensated by the fact that they swell by absorbing water. Generally, these materials provide the best initial seal(7), but there is a lack antimicrobial properties(8).

Antibacterial properties of restorative materials have been evaluated in vitro using various methodologies. Agar diffusion test (ADT) was the standard assay in most of these studies, despite its limitations. Weiss et al. introduced a direct contact test (DCT), which quantitatively measures the effect of direct and close contact between the test microorganism and the tested materials, regardless of the solubility and diffusivity of their components (20, 21, 22, 23, 24 and 25).

The purpose of this study was to investigate the physical-mechanical and antibacterial properties of five different temporary fillings.

Materials and methods

The materials tested in this study are described in the table 1.

Physical-mechanical properties

Microleakage

Seventy recently extracted bovine incisors free of cracks were used. Cavities were prepared in each tooth, in the buccal surface. Preparations were made by a single operator, using spherical no. 4 carbide burs (Jet, Ontario, Canada) and no. 2082 diamond burs (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) in a water-cooled high-speed handpiece. Burs were replaced after 4 cavity preparations to ensure cutting efficacy. The cavities were sauce-shaped, with 3mm of diameter and 1mm of depth, located in the mid-part of the buccal surface. Teeth were stored in distilled water and randomly signed in seven groups (n=10). After the preparations, cavities were filled with the material and covered with polyester trip and cured for 20 s. Light activation of the light cured materials was performed using a LED light curing unit. Immediately, the samples were stored for 24h at 23°C in blue methylene solution after were submitted to thermocycling with 500 cycles from 5° to 55°C, with a dwell time of 30s. Teeth root apexes were sealed with a chemical curing epoxi resin (Durepoxi – Alba Química Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brazil). Two coats of nail varnish were applied over the teeth surfaces, excepting the restoration and a 2mm distance around their margins. The specimens were again immersed in methylene blue solution, for 10mn at 23°C, after were washed in tap water for the same time and dried. The specimens were serially sectioned longitudinally in a buccal-lingual plane in order to obtain 2 (7mm thick) slices from where the dye infiltration would be accessed. Dye leakage was evaluated by two calibrated and blinded examiners using a stereomicroscope (Tecnival, Biosystems Ltda., Curitiba, PR, Brazil) under a 40X magnification with an accuracy of 0.1 mm to measure the length of dye penetration in image tool software.

When disagreement between examiners occurred, consensus was reached.

Water sorption and solubility

Cured cylindrical specimens (diameter 15 mm, thickness 1 mm) were dry-stored at 37 °C and repeatedly weighed after 24 h intervals using an analytical digital balance (AUW220D; Shimadzu) accurate to 0.01 mg, until a constant mass was obtained. The specimens were then individually immersed in distilled water and stored at 37 °C. After 7 days, the surface water of the specimens was removed and the mass of each specimen was recorded again. The specimens were dry-stored again at 37 °C and reweighed until a constant mass was obtained. Water sorption and solubility were calculated as the percentage in mass gain or loss during the sorption and desorption cycles.

Kinetics of polymerization evaluated by RT-FTIR spectroscopy

The degree of conversion of the experimental materials was evaluated using Fourier-transform infrared spectroscopy with a spectrometer (Prestige 21, Shimadzu, Japan) equipped with an attenuated total reflectance device. The reflectance device was composed of a horizontal ZnSe crystal with a 45° mirror angle (PIKE Technologies, Madison, WI, USA). The IRSolution software package (Shimadzu, Columbia, MD, USA) was used in the monitoring scan mode using Happ–Genzel apodization in the range of 1750–1550 cm⁻¹, a resolution of 8 cm⁻¹ and a mirror speed of 2.8 mm/s. With this configuration, one scan was acquired every 1 s during photoactivation. The degree of conversion was calculated as described previously (10) based on the intensity of the carbon–carbon double-bond stretching vibrations (peak height) at 1635 cm⁻¹ and using the symmetric ring stretching at 1610 cm⁻¹ from the polymerized and non-polymerized samples as an internal standard. Analyses were performed in triplicate (n = 3). Data were plotted and curve fitting was applied using logistic non-linear regression. In addition, the polymerization rate (R_p (s⁻¹)) was calculated as the degree of conversion at time t subtracted from the degree of conversion at time $t - 1$. The coefficient of determination was greater than 0.98 for all curves.

Depth of cure

Depth of cure was analyzed by the scraping method. The materials were filled into a cylindrical silicone mold (6 mm diameter, 20 mm height) and irradiated

through a polyester strip for 20 s. The material was extracted from the mold and the uncured material (if any) was removed. The maximum thickness of the cured material was measured with a digital caliper ($n = 3$).

Ultimate tensile strength (UTS)

Ten dumbbell-shaped specimens (length 10 mm x width 5 mm x constriction 1 mm) were prepared for each group using elastomer molds. The top and bottom surfaces were light-activated for 20 s. After confection, the tensile test was conducted in a mechanical testing machine (DL500; EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brazil) at a crosshead speed of 1 mm/min until failure. UTS values were calculated in MPa.

Hardness measurements

Measurements were made according to ASTM D2240 using the Shore D scale hardness tester (PanTec, Panambra Ind.e Técnica SA, São Paulo, SP, Brazil). The measurements were made on specimens with approximately 1.5 mm of thickness. Five specimens per group were tested and four readings were taken at four different positions of each specimen. Mean and standard deviation was calculated from the four readings.

Microbiology test

Biofilm accumulation test

Streptococcus mutans UA159, is one the major species of bacteria responsible for dental caries (11). It was cultured overnight at 37°C in Brain Heart Infusion broth (BHI) under an anaerobic atmosphere. The bacterial suspension obtained was adjusted to an optical density (OD) of 0.5 at 600 nm.

Specimens of 6 mm in diameter and 1 mm of thickness, were suspended into the cavities of a 24-well plate. An aliquot of 2-mL of UTYEB supplemented with 1% sucrose and 20 μ L of bacterial suspension were inoculated into each well. The biofilms on discs were washed daily, 3 times, in 0.9% NaCl and transferred to a new plate with fresh UTYEB containing 1% sucrose for 24h. This procedure was repeated for 3 days. All plates were incubated at 37°C in an environment of 5-10% CO₂ (Anaerobac—Probac do Brasil products Bacteriological Ltda., Santa Cecília, SP,

Brazil) in anaerobic jars (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda). After 72 h of biofilm growth, the discs containing the biofilms were washed 3 times in 0.9% NaCl and individually transferred to microcentrifuge tubes containing 1 ml of 0.9% NaCl. The tubes were sonicated at 30 W for 30 s (Sonicator DE S500, R2D091109 Brazil) to detach the biofilms formed on the discs.

For the bacterial viability, an aliquot of 100 µl of the biofilm suspension was serially diluted in 0.9% NaCl in series up to 10⁻⁷ and 2 drops of 20 µl of each dilution were inoculated on BHI agar (BD, Sparks, USA) to determine the number of viable microorganisms(12). The plates were incubated for 72 h at 37°C under an environment of 5-10% CO₂ (Anaerobac - Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda., Santa Cecília, SP, Brazil) produced in anaerobic jars (Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda). CFU were counted and the results were expressed in CFU/mg of biofilm dry weight (13).

Modified Contact direct test

Enterococcus faecalis ATCC 4083 isolated from aperiapical abscess, was used as the tested microorganism. It was cultured overnight at 37°C in tryptic soy agar (TSA) plates in an aerobic atmosphere. *E. faecalis* was inoculated in tryptic soy broth (TSB) and the bacterial turbidity was adjusted to an optical density (OD) of 0.5 at 600 nm.

Cylinders of 6 mm in diameter and 1mm thickness were placed into the wells of a 96-wells plate. Subsequently, 10µL of bacterial suspension was placed onto the surface of the materials tested. Strain suspensions (10µL) placed in uncoated wells served as non-exposed (positive) controls. Materials incubated without bacteria served as negative controls. All samples were incubated aerobically for 1 and 24 h at 37°C in >95% humidity; then 240 µL of TSB was added to each of the wells and gently mixed with a pipette for 1 min. Serial dilutions were prepared in TSB and plated onto TSA and incubated in aerobic environment for 24 h at 37°C. The CFU were counted and CFU/mL was calculated(14). Experiments were performed in duplicate.

Cytotoxicity Assay

Discs of each material were fabricated under aseptic conditions in sterile cylindric silicone disc with a 5-mm diameter and a 1-mm height. Cytotoxicity of the materials was assessed after 24 h. The extraction was made in cell culture medium. The extraction vials were incubated for 24 h at 37°C. Control samples containing only culture medium were treated similarly. Undiluted extracts were used for the testing.

The viability of fibroblast (NCTC clone 929) cells was determined by measuring the reduction of soluble MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma, St. Louis, MO, USA) to water-insoluble formazan. Briefly, cells were seeded at a density of 2×10^4 cell per well in a volume of 200 μ l in 96-well plates and grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ 95%. After incubation for 24 h, the medium was aspirated from all wells and replaced with 200 μ L/well extract or control medium and incubated for another 24 h. Thereafter, the incubation medium was removed, and subsequently 180 μ l of medium and 20 μ l MTT (5 mg MTT/ml solution) were added to each well. The plates were incubated for an additional 4 h, and the medium was discarded. DMSO was added to each well, and the formazan was solubilized on a shaker for 5 min. The formazan content of each well was computed as a percentage of the control group (untreated cells). All assays were repeated 3 times to ensure reproducibility. Cytotoxicity responses were rated as severe (30%), moderate (30%–60%), slight (60%–90%), or noncytotoxic (>90%) (15).

Statistical analyses

The equality of the variances and the normal distribution of the errors were checked for all tested response variables. Those that did not satisfy these conditions were submitted to transformations as an attempt to fulfill parametric assumptions.

The data of; microleakage, water sorption, deep of cure, and direct contact test in 1h, were submitted to non-parametric Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Microbiological assays: The CFU count data were non-normal and log transformed. Subsequently, statistical analyses were performed with the transformed data. A $\log_{10}$ transformation of each CFU count was performed to normalize the data before statistical evaluation due to the high range of bacterial numbers. Then, to determine

viable bacteria counts, statistical analyses were performed using one-way ANOVA and the Fisher's least significance difference (LSD) post hoc test for pair-wise means comparisons. For the UTB, solubility, hardness Shore D, direct contact test in 24h and biofilm accumulation were used ANOVA and complementary test Student Newman Keuls. All statistical testing was performed using Sigma Stat® for Windows Software®, Version 3.5 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA), using a pre-set alpha of 0.05.

Results

Physical-mechanical properties

For the microleakage, the cavities restored with GIC, B and FM exhibited significantly lower leakage than the other groups (Fig 1A). The following mean percentages of microleakage were found: IRM 97,2%, R 96,0%, L 94,2%, F 90,1%, FM = 83,2%, GIC 72,3%, and B 58,8%. Statistically, significant differences were found in the comparison of R, IRM, B and GIC to the other groups.

The results of water sorption and solubility are demonstrated in Figure 1B. The highest sorption values were obtained for B, FM and L, followed by R and F, which showed the lowest sorption ($p < 0.001$). The highest values of solubility were shown for L, and the lowest levels were presented in FM and R ($p < 0.001$).

Fig 1C-1D show the degree of conversion (DC %) and the development of the polymerization rate (R_p) as a function of time for the different materials tested. The F demonstrated a low final DC and R_p values lesser than 30%.

The depth cure showed difference statically significant ($p < 0,001$). The R showed lowest value than B than present highest value, and the others presented intermediate values (Table 2).

For the Ultimate tensile strength (Table 2), the R showed statistically significant difference highest than other materials. FM and L presented the lowest value and the intermediate values were observed in B and F ($p < 0.001$).

The results of the Hardness shore D are expressed in Table 2. R showed statistically higher value than L. The others materials B, FM and F are statistically similar ($p < 0.001$).

Microbiological effect

Biofilm development of *S. mutans* was significantly affected by the materials. (Fig 2), except to F. The results of the DCT after 1h showed that L e B were significantly more potent bacterial growth inhibitor than the others ($p < 0.001$).

Otherwise, the results of DCT after 24 h (Fig 3B), showed that B, F, and R showed higher CFU values than FM and L ($p < 0.001$).

Luxatemp continued to be effective for 1h and 24h of DCT against *E. faecalis*. Fill Magic tempo showed antimicrobial activity only after 24h of DCT.

Cytotoxicity assay

The Luxatemp was statistically more cytotoxic than all other materials tested ($p < 0.001$). On the other hand, the Fill Magic demonstrated cell viability close to 100%. Cytotoxicity data are summarized in Figure 4.

Discussion

In vitro tests remain an indispensable method for initial screening of dental materials and set a theoretical maximal amount of leakage that could be present *in vivo* ⁽¹⁶⁾ Dye leakage is the cheapest and fastest method to test the sealing ability of restorative materials(17). Drawbacks, however, are associated to this test. Besides the difficulties to reproduce all the challenges restorations face in the oral environment through this method, the wide methodological variation in microleakage tests found in literature makes difficult a reliable comparison between studies(18). Some examples are the different measurement methods for microleakage and the dyes and markers used, with different composition, pH, molecular weight and concentration (16, 19). Also, different immersion times are reported in the studies, which oscillate from 4h to 72h (17). In this study, immersion in methylene blue solution 0.5% for 24h was adopted. These parameters were reported in a systematic review about microleakage tests as the most commonly found parameters in the studies evaluated(18).

The microleakage in temporary filling material is a very important property, with respect to its ability to seal the cavity preventing contamination of the canal

which could lead treatment failure. Furthermore, dentin is a heterogeneous, less mineralized and moist tissue, making the adhesive process a real challenge and affecting the durability of the bond and the marginal sealing of the restorations. In this study, better marginal sealing was observed with GIC, FM and B placements. Our findings of B corroborate with those observed by Pieper et al.(7). These results can be explained because the materials are resin-based and need a light source to be polymerized producing contraction and in the presence of the water has an expansion (8). The result obtained for the CIV were opposite to other studies(7, 20) Pieper et al.(7) found higher microleakage in GIC restorations than in B ones. However, our results for the GIC are similar to those published by De Castro et al.(21) even though the scale and methodology used by both studies were different. The GIC present little or no exothermic reaction or shrinkage during setting, have no free monomer in the set matrix, and adhere to tooth structure. Based on its adhesion potential, it could be expected that the marginal sealing produced by GICs is good(5, 22). Different studies indicate that IRM showed greater microleakage(23), the present study found similar results.

The results WS could be associated with the microleakage. In this study, B showed better sealing and greatest WS values (Fig 1A-1B). L also has a good sorption but also showed higher solubility, which facilitates the microleakage. The R showed lower WS probably because it did not have the appearance of expansion gaps which facilitate microleakage (Fig 1A-1B). Pieper et al.(7) evaluated the WS and SL of the B used in this study, however it is not possible to compare because used different unit. The property of sorption and solubility of the resinous materials are affected by many factors including the chemical composition, the presence of hydrophilic constituents in the resin matrix (24), and the structural parameters of the polymeric network such as cross-linking density and porosity (25).

In the polymerization kinetics, the L was not considered in the results because it was not possible identify a peak (1610 cm^{-1}) for analysis. The polymerization rate of the other materials were evaluated and kept stable after 20s of light curing. In Figure 1D, it can be observed that the highest rate of polymerization occurs in the first 5s, which would indicate that probably are used more than one co-initiator in their composition (26).

These materials have advantages such as polymerization greater than 4 mm in one increment. This property was evaluated by the depth of cure, and it can be observed that all materials cured more than 4mm with the exception of R. The common characteristic of these materials is the translucency, which facilitates the passage of light that might indicate a minor amount of inorganic filler. R showed lowest depth of cure that can explained by inorganic composition. This material is used for provisional restorations prosthesis and for this reason it need to have good mechanical resistance.

This is the first investigation about the antimicrobial effect of temporary filling materials against *S. mutans* biofilm formation. It is known that *S. mutans* are important in the development of caries(27) and that biofilms are more resistant than planktonic. The B and FM showed better effect against *S. mutans*. However, FM was the only material that exhibited antibacterial properties when in contact with *S. mutans* for 3 days and over 24h of DCT with *E. faecalis* in this study.

In this study, to evaluate the antibacterial effect closed *Enterococcus faecalis* because it is the most commonly bacteria found after unsuccessful endodontic treatment(28). Antibacterial properties of restorative materials have been evaluated *in vitro* using various methodologies. Agar diffusion test (ADT) was the standard assay in the most of these studies (29). The DCT is a method that provides information on bacterial viability and growth rate(30). It allows estimation of the number of the viable bacteria after periods of incubation in contact direct and reproducible method that simulates the contact of the microorganism test with materials. In endodontics, the difficulties in eliminating *E. faecalis* from the root canal system may be related to its ability to penetrate dentinal tubules and to organize into biofilms. Antibacterial activity of the materials might help to eliminate microorganism present in the conduct and thereby improve the success of endodontic treatment.

After 24h of DCT, L had the strongest antibacterial activity against *E. faecalis*, followed by FM. Of all the samples, R and F had the lowest antimicrobial activity. In a previous study, R and F also were assessed with concern to their antibacterial activity (3). Similarly to our findings, R revealed no antimicrobial effect against *E. faecalis* However, the results of F are different from those found in our

study and F also did not show no antibacterial effect in that previous study (3). The FM and L after 24 h presented antimicrobial activity against *E faecalis*.

The L showed highest toxicity, many are the components that influence the biocompatibility as monomers, photoinitiator or fillers (31, 32). Usually the manufacturers are reluctant to reveal the complete information of their product. However, the toxic effect of Luxatemp could explain the antibacterial effect against *E faecalis* after 24h in DCT.

In conclusion, the physical-mechanical properties depended on the tested material. Bioplic®, followed by Fill Magic tempo® and the glass ionomer cement had exhibited the best performance regarding microleakage. With concern to *S. mutans* biofilm accumulation assay and DCT with *E. faecalis*, Fill Magic tempo had the strongest antibacterial effect.

Acknowledgments

The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brazil) for the financial support.

The authors have not declared any conflicts of interesting this study.

References

1. Heling I, Gorfil C, Slutzky H, Kopolovic K, Zalkind M, Slutzky-Goldberg I. Endodontic failure caused by inadequate restorative procedures: Review and treatment recommendations. Journal of Prosthetic Dentistry. 2002;87(6):674-8.
2. Orstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial-infection during treatment of apical periodontitis - a pilot-study. International Endodontic Journal. 1991;24(1):1-7.
3. Slutzky H, Slutzky-Goldberg I, Weiss EI, Matalon S. Antibacterial properties of temporary filling materials. Journal of Endodontics. 2006;32(3):214-7.

4. Aledrissy HI, Abubakr NH, Ahmed Yahia N, Eltayib Ibrahim Y. Coronal microleakage for readymade and hand mixed temporary filling materials. *Iran Endodontic Journal*. 2011;6(4):155-9.
5. Naoum HJ, Chandler NP. Temporization for endodontics. *International Endodontic Journal*. 2002;35(12):964-78.
6. Ciftci A, Vardarli DA, Sonmez IS. Coronal microleakage of four endodontic temporary restorative materials: An in vitro study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*. 2009;108(4):E67-E70.
7. Pieper CM, Zanchi CH, Rodrigues-Junior SA, Moraes RR, Pontes LS, Bueno M. Sealing ability, water sorption, solubility and toothbrushing abrasion resistance of temporary filling materials. *International Endodontic Journal*. 2009;42(10):893-9.
8. Deveaux E, Hildebert P, Neut C, Boniface B, Romond C. Bacterial microleakage of cavit, irm, and term. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*. 1992;74(5):634-43.
9. Carvalho RM, Pereira JC, Yoshiyama M, Pashley DH. A review of polymerization contraction: The influence of stress development versus stress relief. *Operative Dentistry*. 1996;21(1):17-24.
10. Stansbury JW, Dickens SH. Determination of double bond conversion in dental resins by near infrared spectroscopy. *Dental Materials*. 2001;17(1):71-9.
11. Burne RA. Oral streptococci... Products of their environment. *Journal of Dental Research*. 1998;77(3):445-52.
12. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 2001;44(2):121-9.
13. Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Research*. 2008;42(5):380-6.
14. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers by Modified Direct Contact Test Against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2009;35(7):1051-5.

15. Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*. 2006;23(1):17-22.
16. Roulet JF. Marginal integrity: clinical significance. *Journal of Dentistry*. 1994;22(SUPPL. 1):S9-S12.
17. Alani AH, Toh CG. Detection of microleakage around dental restorations: A review. *Operative Dentistry*. 1997;22(4):173-85.
18. Raskin A, Gonthier S, D'Hoore W, Degrange M, Dejou J. Microleakage In vitro tests: literature review of methodology and meta-analysis. *Journal of Dental Research*. 2001;80(4):1233-.
19. Amarante de Camargo DA, Sinhoreti MAC, Correr-Sobrinho L, de Sousa Neto MD, Consani S. Influence of the methodology and evaluation criteria on determining microleakage in dentin - Restorative interfaces. *Clinical Oral Investigations*. 2006;10(4):317-23.
20. Beckham BM, Anderson RW, Morris CF. An evaluation of three materials as barriers to coronal microleakage in endodontically treated teeth. *Journal of Endodontics*. 1993;19(8):388-91.
21. De Castro PH, Pereira JV, Sponchiado EC, Marques AA, Garcia LaF. Evaluation of marginal leakage of different temporary restorative materials in Endodontics. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2013;4(4):472-5.
22. Mohammadi Z, Shalavi S. Clinical applications of glass ionomers in endodontics: a review. *International Dental Journal*. 2012;62(5):244-50.
23. Mayer T, Eickholz P. Microleakage of temporary restorations after thermocycling and mechanical loading. *Journal Endodontic*. 1997;23(5):320-2.
24. Moraes RR, Goncalves LS, Lancellotti AC, Consani S, Correr-Sobrinho L, Sinhoreti MA. Nanohybrid Resin Composites: Nanofiller Loaded Materials or Traditional Microhybrid Resins? *Operative Dentistry*. 2009;34(5):551-7.
25. Beatty MW, Swartz ML, Moore BK, Phillips RW, Roberts TA. Effect of cross-linking agent content, monomer functionality, and repeat unit chemistry on properties of unfilled resins. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1993;27(3):403-13.

26. Ely C, Schneider LFJ, Ogliari FA, Schmitt CC, Correa IC, Lima GdS, et al. Polymerization kinetics and reactivity of alternative initiators systems for use in light-activated dental resins. *Dental Materials*. 2012;28(12):1199-206.
27. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal Dental Research*. 1994;73(3):672-81.
28. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *Journal of Endodontics*. 2006;32(2):93-8.
29. Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endodontics & Dental Traumatology*. 1996;12(4):179-84.
30. Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Surface antibacterial properties of packable resin composites: Part I. *Quintessence International*. 2004;35(3):189-93.
31. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *Journal of Dental Research*. 2001;80(7):1615-20.
32. Volk J, Ziemann C, Leyhausen G, Geurtsen W. Non-irradiated campherquinone induces DNA damage in human gingival fibroblasts. *Dental Materials*. 2009;25(12):1556-63.

Table and figures

Table 1. Materials composition used in this study

Temporary material	Abbreviation	Batch number	Manufacturer	Components
Bioplic	B	96012	Biodinamica, Londrina Brazil	Dymethacrylate groups, organic filler, silicium dioxide, catalysts and sodium fluoride
Fill Magic tempo	FM	1200326	Vigodent coltene Brazil	UDMA, TEGMA, EDAB, BHT, photoiniciator and fillers
Fermit N	F	P47675	Ivoclar vivadent	dymethacrylates, fillers of silicon dioxide and copolymers, catalysts and stabilizers
Luxatemp LC	L	644973	DMG Hamburg	Inorganic and organic filler, matrix of multifuncional acrylates; catalysts, stabilizers, additives.
Revotek LC	R	1201121	GC America Inc.	urethane dymethacrylate, silica powder, camphorquinone

Table 2. Mechanical properties of the different materials tested. (Mean $\pm$ SD)

	Cohesive Strenght (Mpa)	Depth of cure (mm)	Shore Hardness D
Bioplic	8.98 $\pm$ 2.4b	8.52 $\pm$ 0,1a	55.13 $\pm$ 1.8b
Fill Magic tempo	5.78 $\pm$ 0.9c	7.24 $\pm$ 0,2b	54.56 $\pm$ 2.8b
Fermit	9.58 $\pm$ 1.9b	7.44 $\pm$ 0,4b	56.00 $\pm$ 2.8b
Luxatemp	4.43 $\pm$ 1.4c	6.67 $\pm$ 0,6b	32.01 $\pm$ 1.9c
Revotek	32.8 $\pm$ 3.2a	5.55 $\pm$ 0,1c	77.50 $\pm$ 1.8a

Different letters represent statistically significant differences between groups ($p < 0.05$).

Figures

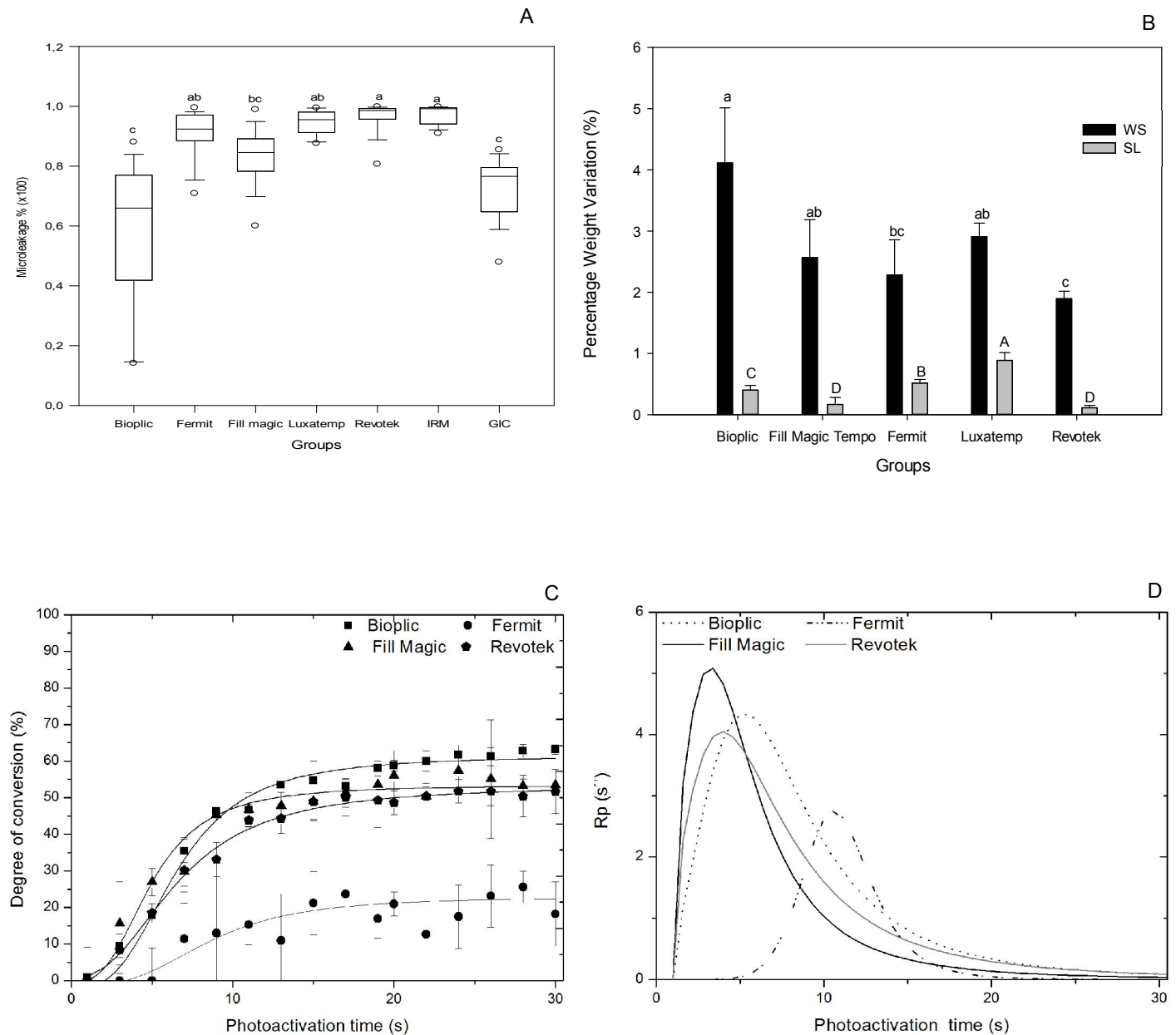


Figure 1. (A) Microleakage after 1000 cycles, (B) water sorption and solubility expressed in %wt, (C) Degree of conversion (D) Polymerization rate R_p (s^{-1}) of materials tested. Different letters represent statistically significant differences between groups ($p < 0.05$).

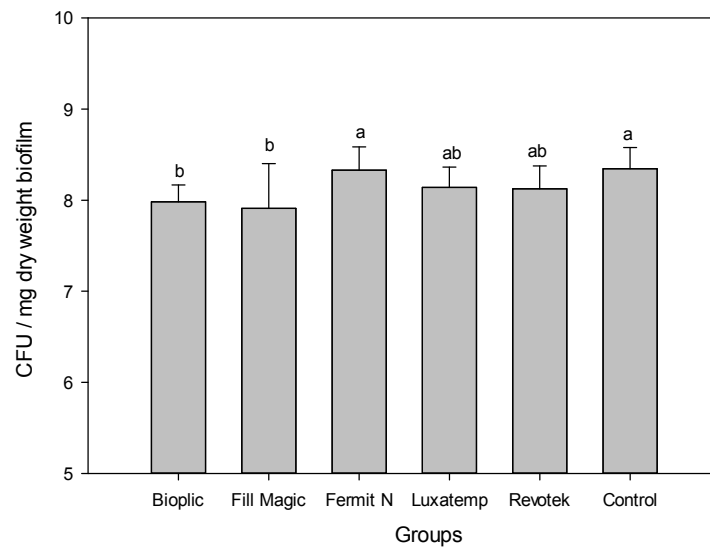


Figure 2. *S. mutans* UA159 accumulation test after 3 days of biofilm formation under continuous exposure of 1% sucrose. Different letters represent statistically significant differences between groups ($p < 0.05$).

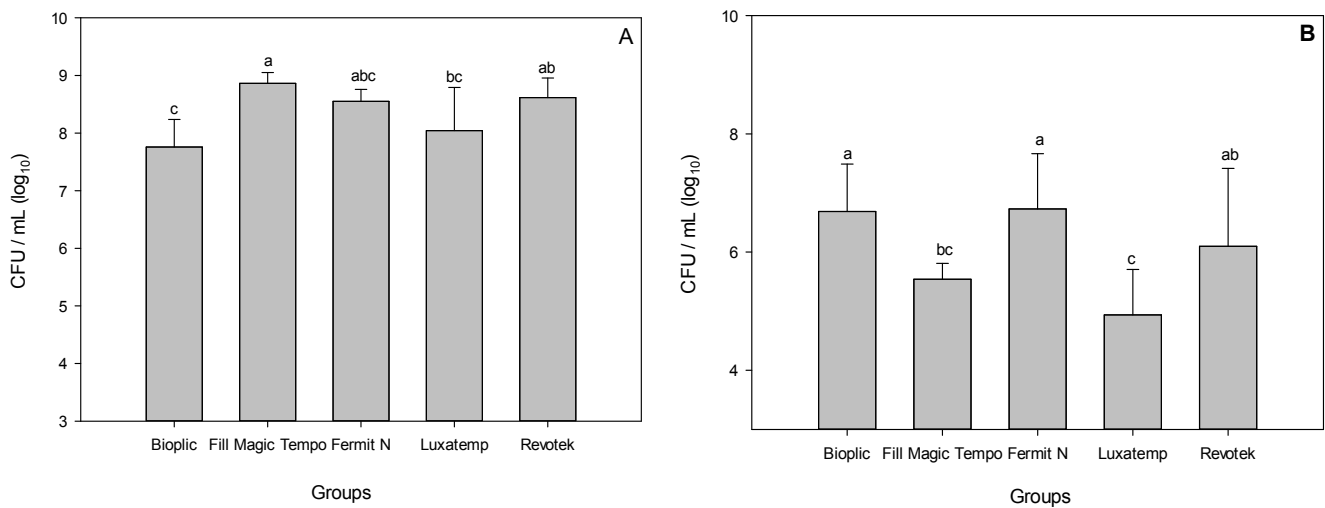


Figure 3. Survival of *E. faecalis* ATCC4083 after direct contact with temporary filling materials; (A) temporary filling for 1 h. (B) temporary filling for 24 h. All materials light cured. Different letters represent statistically significant differences between groups ($p < 0.05$).

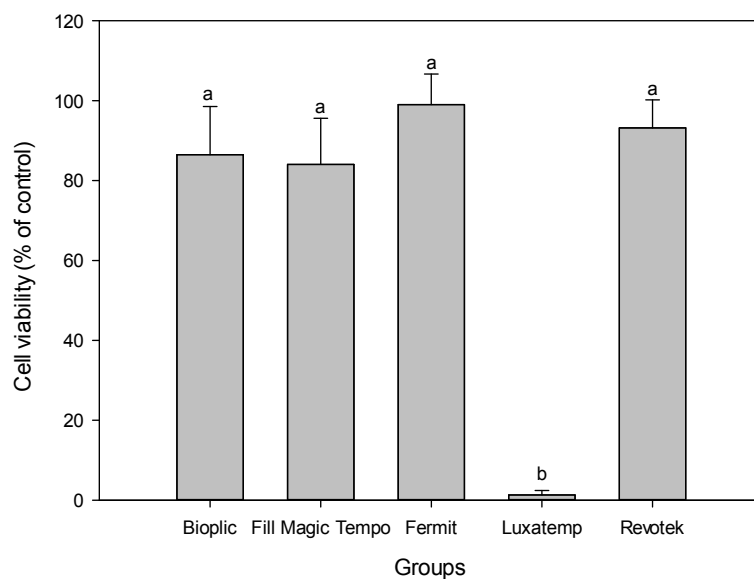


Figure 4. The cytotoxic effects after exposure to MTFs in L929 fibroblast cells. Results are expressed as mean and standard. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

5 Artigo 2²

Characterization of a novel bulk-fill elastomeric temporary restorative composite

Sonia L. Peralta^a, André L. Dutra^a, Sávio B. de Leles^b, Fabricio A. Ogliari^c,
Adriana F. Silva^a, Evandro Piva^a, Rafael G. Lund^{ab}

^aSchool of Dentistry, Federal University of Pelotas, Department of Restorative Dentistry, Pelotas, RS, Brazil

^bLaboratory of Oral Microbiology, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^cMaterials Engineering School, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

Rafael Guerra Lund, Corresponding author. Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas. Rua Gonçalves Chaves, 457, Sala 503, Pelotas, RS, Brazil. CEP: 96015-560. Tel/Fax: +55-53-3222-6690. e-mail: rafael.lund@gmail.com

² Este trabalho sera submetido para o *Journal of Dentistry*, e está formatado conforme as normas deste periódico (<http://www.elsevier.com/journals/journal-of-dentistry/0300-5712/guide-for-authors> acessada 11/04/2014)

Abstract

Objectives

This study investigated the physical and mechanical properties, antibacterial effect and biocompatibility of novel elastomeric temporary resin-based filling materials (TFMs) containing zinc methacrylate (ZM).

Methods

Experimental TFMs were prepared by mixing the zinc methacrylate with monomer, co-monomer, photoinitiator and fillers. A ZM concentration of 0 [control], 0.5% [Z0,5]; 1% [Z1], 2% [Z2], or 5% [ZM5] wt % was added to the TFMs. The Fermit-N [F] was used as commercial reference. Microleakage, water sorption/solubility, degree of conversion, depth of cure, ultimate tensile strength, and hardness were determined and compared. A modified direct contact test (DCT) with *Enterococcus Faecalis* and a *Streptococcus mutans*' biofilm accumulation assay were carried out to evaluate the antimicrobial effect and cytotoxicity assay. Statistical comparisons were performed ($\alpha=5\%$).

Results

The results showed that the physical and mechanical properties of the experimental TFMs with ZM are comparable with the properties of the commercial reference and some properties were improved (shortest microleakage and water sorption and highest values of ultimate tensile strength). TFMs with ZM killed *E. faecalis* only after 1h. Biofilm development of *S. mutans* were not affected by the inclusion of ZM in the experimental TFMs.

Conclusions

The present findings suggest that experimental elastomeric TFM showed effect against *E. faecalis* after 1h exposition and improvements regarding microleakage, water sorption, degree of conversion, depth of cure and cohesive strength.

Keywords: temporary filling material, zinc methacrylate, antimicrobial, microleakage.

1. INTRODUCTION

Temporary filling materials are commonly used for the coronal sealing, avoiding the biological contamination and penetration of saliva, nutrients, chemicals and also microorganisms and their byproducts during and after endodontic treatment. Coronal microleakage appears to be of equal or greater clinical relevance as a factor in endodontic failure than apical leakage due to risk of recontamination (1). Hence, the most important function of the temporary filling materials during and after endodontic treatment is their sealing ability and prevention of microleakage(2). Despite of use of intracanal dressing between appointments of endodontic therapy, some studies reported presence of residual flora after its use(3). TFMs with good sealing and bactericidal properties may be advantageous in preventing bacterial invasion. Nowadays, the dental materials are expected to have low cytotoxicity and to prevent bacterial colonization and biofilm formation on their surfaces (Heyder et al., 2013). Several TFMs with different microstructures, compositions and setting mechanisms are available commercially(4): reinforced zinc-oxide eugenol based materials, calcium sulfate-based materials, composite resin based materials, resin reinforced glass-ionomer materials, and traditional glass-ionomer materials(1, 5). Generally, all these materials were adequate if placed in a thickness of 3mm or greater(6).

Recently, new resin-based materials were introduced as temporary restorative materials (4, 7). These materials contain monomer, initiator system filler and additives. Resin-based temporary material must be bonded to provide an effective seal, because they undergo polymerization shrinkage of 1 to 3% (8, 9). This contraction is compensated by the fact that they swell by absorbing water. Generally, these materials provide the best initial seal(4), but lack antimicrobial properties(9).

Different antimicrobials agents incorporated into composite and adhesive systems are known, such as the 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB), which is effective for providing antibacterial properties(10). The quaternary ammonium salt (QAS) were monomethacrylates, and a quaternary ammonium dimethacrylate (QADM) was recently synthesized (11-13) and included in antimicrobial formulations. Furthermore, zinc methacrylate((14) is a monomer that had demonstrated inhibition of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)(15).

The zinc methacrylate is a monomer that contains a functional methacrylate group in its structure that is also found in other monomers. The use of a copolymerizable monomer with zinc in its constitution is very promising. Zinc is a metallic chemical element with an antibacterial effect(14). However, until now, was not added in temporary resin-based materials.

The aim of this study was to evaluated the selective physical and mechanical properties, and antibacterial effects of a novel temporary elastomeric filling materials (TFMs) containing zinc methacrylate monomer (ZMM). The null hypotheses to be tested is that temporary filling materials (TFMs) containing zinc methacrylate monomer will show antibacterial effect and physical-mechanical properties compared to the commercial reference tested.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Material and Reagents

The exothane 8 (Esstech Inc., Essington, PA, USA), ethoxylated bisphenol A diglycidyl ether dimethacrylate with 30 ethylene oxide units (Bis-EMA 30, Esstech) triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA, Esstech), were used as received. The photosensitizer camphorquinone (CQ – Esstech) and the co-initiator ethyl 4-(dimethylamino) benzoate (EDAB – Sigma–Aldrich), diphenyliodonium hexafluorophosphate (DPIHFP) were used to render the materials photocurable and as filler Silica particles and zinc methacrylate (Aldrich Chemical Co. Milwaukee, WI, USA).

The final concentrations of zinc methacrylate tested were: 0%wt [C = temporary restorative composite], 0.5%wt [Z0.5]; 1%wt [Z1], 2%wt [Z2], and 5%wt [Z5]. Photoactivation procedures were carried out using a light-emitting diode unit (Radii; SDI, Bayswater, Victoria, Australia) with 800-mW/cm² irradiance.

The Fermit-N (Ivoclar Vivadent) [F] was used as a commercial reference.

2.2. Microleakage

Sixty recently extracted bovine incisors free of cracks were used. Cavities were prepared in each tooth, in the buccal surface. Preparations were made by a single operator, using spherical no. 4 carbide burs (Jet, Ontario, Canada) and no. 2082 diamond burs (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) in a water-cooled high-speed handpiece. Burs were replaced after 4 cavity preparations to ensure cutting efficacy. The cavities were sauce-shaped, with 3mm of diameter and 2mm of depth, located in the mid-part of the buccal surface. Teeth were randomly signed in seven groups (n=10). After the preparations, cavities were filled with the material and covered with polyester trip and cured for 20 s. All materials were used according to manufacturer's instructions. Light activation of the light cured materials was performed using a LED light curing unit. Immediately, the samples were stored for 24h at 23°C in blue methylene solution after were submitted to thermocycling with 1000 cycles from 5° to 55°C, with a dwell time of 30s. Teeth root apexes were sealed with a chemical curing epoxi resin (Durepoxi – Alba Química Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brazil). Two coats of nail varnish were applied over the teeth surfaces, excepting the restoration and a 2mm distance around their margins. The specimens were again immersed in methylene blue solution, for 10mn at 23°C, after were washed in tap water for the same time and dried. The specimens were serially sectioned longitudinally in a buccal-lingual plane in order to obtain 2 (7mm thick) slices from where the dye infiltration would be accessed. Dye leakage was evaluated by two calibrated and blinded examiners. The measure the length of dye penetration in image tool software, this photography was taked with a stereomicroscope (Tecnival, Biosystems Ltda., Curitiba, PR, Brazil) under a 40X magnification with an accuracy of 0.1 mm to.

When disagreement between examiners occurred, consensus was reached.

2.3. Water Sorption and Solubility

Ten cured cylindrical specimens with dimensions: 15mm in diameter and 1.0 mm in thickness, were fabricated in a plastic mold between 2 glass slides covered with polyethylene film. Then, the specimens were removed from their molds, held with a gripper and dry-stored in a desiccator containing freshly dried silica gel and calcium chloride at 37°C. After 24 h, the specimens were weighed with a precision balance of 0.01 mg (model AUW220D, Shimadzu, São Paulo, Brazil). This cycle was repeated

until a constant mass (m_1) was obtained. The discs were immersed in distilled water at 37 °C for 7 days, removed, blotted dry, and re-weighed (m_2). Thereafter, the specimens were again dried inside a desiccator and weighed daily to record a third constant mass (m_3), as was previously described. For each disc, the data for water sorption (WS) and solubility (SL) were calculated as the percentage in mass gained or lost during the sorption and desorption cycles(16).

2.4. Degree of conversion

The C double bond; length as m-dash C conversion of the TFMs ($n = 5$) was determined using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (Prestige 21 spectrometer Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), equipped with an attenuated total reflectance attachment incorporating a horizontal diamond crystal with a 45° mirror angle (PIKE Technologies, Madison, WI, USA). The LED curing unit was rigidly held in position, enabling standardization of the distance between the fiber tip and the top of the sample at 5 mm. Infrared analysis was performed at a controlled room temperature of 23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) and 60% ($\pm 5\%$) relative humidity. Approximately 5 mg of each sample was dispensed directly onto the diamond crystal and covered with clear polyester, after which the degree of conversion was evaluated (Dentsply Caulk). The spectra of the uncured and cured (after 20 s of photo-activation) TFMs were acquired between 1,690–1,575 cm^{-1} , averaging 12 scans at the 4 cm^{-1} resolution transmission mode, to provide a single spectrum. Spectra of each unpolymerized TFMs were also captured (i.e., a single scan was also collected immediately prior to light curing). The extent of the unreacted aliphatic carbon double bonds (% C=C) was determined from the ratio of the absorbance intensities of the aliphatic C=C (peak height at 1,637 cm^{-1}) to that of an aromatic C=C absorbance of the internal standard component (1,608 cm^{-1}), both before and after curing the specimen. The baseline method used to determine peak height absorbance has been described previously(17).

2.5. Depth of Cure

Depth of cure was analyzed by the scraping method. The materials were filled into a cylindrical silicone mold (6 mm diameter, 20 mm height) and irradiated through a polyester strip for 20 s. At the end of the irradiation period, we immediately removed

the composite sample from the mold, and removed the uncured material at the bottom of the sample by scraping it away manually with a spatula 24. Using a digital caliper, three samples of each material was used to determine the material's mean depth of cure.

2.6. Dimensional alterations

The TFMs were placed into cylindrical silicone molds (20 mm height, 6 mm diameter) and covered with a polyester strip, cured with the LED curing unit for 20 s. The sample was then removed from the molds, measured for length with a caliper, and stored in 100% humidity and incubated at 37°C. The other procedures were the same as the study of Versiani et al (18) to obtain the dimensional changes of the sample after 30 days of storage.

2.6. Ultimate Tensile Strength (UTS)

Ten dumbbell-shaped specimens (length 10 mm x width 5 mm x constriction 1 mm) were prepared for each group using elastomer molds. The top and bottom surfaces were light-activated for 20 s. After confection, the tensile test was conducted in a mechanical testing machine (DL500; EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brazil) at a crosshead speed of 1 mm/min until failure. UTS values were calculated in MPa.

2.7. Shore Hardness Measurements

Measurements were made according to ASTM D2240 using the Shore D scale hardness tester (PanTec, Panambra Ind.e Técnica SA, São Paulo, SP, Brazil), noting that measurements were also made on specimens approximately 15 mm thick and 6 mm diameter (n=4). However, measurements were still made in specified depths of 0.5; 5; 10 and 13 mm. Three readings were taken for each depth in the specimens and the mean calculated.

2.8. Biofilm Accumulation Test

Streptococcus mutans UA159, a well-described cariogenic pathogen and the strain selected for genomic sequencing (Ajdic et al., 2002), was cultured overnight at 37°C

in Brain Heart Infusion broth (BHI) in an anaerobic atmosphere. The bacterial suspension obtained was adjusted to an optical density (OD) of 0.5 at 600 nm.

Specimens of 6 mm in diameter and thickness 1 mm, were suspended in the wells of a 24-well plate. A 2-mL of UTYEB supplemented with 1% sucrose and 20 µL of bacterial suspension were inoculated into each well. Daily the biofilms on discs were washed 3 times in 0.9% NaCl and transferred to a new plate with fresh UTYEB containing 1% sucrose for 24h. This procedure was repeated for 3 days. All plates were incubated at 37°C in an environment of 5-10% CO₂ (Anaerobac—Probac do Brasil products Bacteriological Ltda., Santa Cecília, SP, Brazil) in anaerobic jars (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda). After 72 h of biofilm growth, the discs containing the biofilms were washed 3 times in 0.9% NaCl and individually transferred to microcentrifuge tubes containing 1 ml of 0.9% NaCl. The tubes were sonicated at 30 W for 30 s (Sonicator DE S500, R2D091109 Brazil) to detach the biofilms formed on the discs.

For the bacterial viability, an aliquot of 100 µl of the suspension was serially diluted in 0.9% NaCl in series up to 10⁻⁷ and 2 drops of 20 µl of each dilution were inoculated on BHI agar (Difco, Becton Dickinson and Co., Sparks, USA) to determine the number of viable microorganisms(19). The plates were incubated for 72 h at 37°C under 5-10% CO₂ (Anaerobac - Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda., Santa Cecília, SP, Brazil) in anaerobic jars (Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda). CFU were counted and the results were expressed as CFU/mg of biofilm dry weight(20).

2.9. Modified Contact Direct Test

Enterococcus faecalis ATTC4083 isolated from a periapical abscess, and was used as a test microorganism. It was cultured overnight at 37°C in tryptic soy agar (TSA) plates under an aerobic atmosphere. *E. faecalis* was suspended in tryptic soy broth (TSB) and adjusted to an optical density (OD) of 0.5 at 600 nm.

Cylinders of 6 mm in diameter and thickness 1mm were placed in the wells of a 96-wells plate. Subsequently, 10µL of bacterial suspension was placed onto the surface of the materials tested. Strain suspensions (10µL) placed in uncoated wells served as nonexposed (positive) controls. Materials incubated without bacteria served as

negative controls. All samples were incubated aerobically for 1 and 24 h at 37°C in >95% humidity; then 240 mL of TSB was added to each well and gently mixed with a pipette for 1 min. Serial dilutions were prepared in TSB and plated onto TSA. After aerobic incubation for 24 h at 37°C, CFUs were counted, and CFU/mL were calculated (21). Experiments were performed in duplicate.

2.10. Cytotoxicity Assay

Discs of each TFMs were fabricated under aseptic conditions in sterile cylindric silicone disc with a 5-mm diameter and a 1-mm height. Cytotoxicity of the TFMs was assessed after 24 h. The extraction was made in cell culture medium. The extraction vials were incubated for 24 h at 37°C. Control samples containing only culture medium were treated similarly. Undiluted extracts were used for the testing.

The viability of fibroblast (NCTC clone 929) cells was determined by measuring the reduction of soluble MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolidium bromide; Sigma, St. Louis, MO, USA) to water-insoluble formazan. Briefly, cells were seeded at a density of 2×10^4 cell per well in a volume of 200 μ l in 96-well plates and grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ 95%. After incubation for 24 h, the medium was aspirated from all wells and replaced with 200 μ L/well extract or control medium and incubated for another 24 h. Thereafter, the incubation medium was removed, and subsequently 180 μ l of medium and 20 μ l MTT (5 mg MTT/ml solution) were added to each well. The plates were incubated for an additional 4 h, and the medium was discarded. DMSO was added to each well, and the formazan was solubilized on a shaker for 5 min. The formazan content of each well was computed as a percentage of the control group (untreated cells). All assays were repeated 3 times to ensure reproducibility. Cytotoxicity responses were rated as severe (30%), moderate (30%–60%), slight (60%–90%), or noncytotoxic (>90%) (22).

Statistical analyses

The equality of the variances and the normal distribution of the errors were checked for all tested response variables. Those that did not satisfy these conditions were submitted to transformations as an attempt to fulfill parametric assumptions. The CFU count data were non-normal and log transformed. Subsequently, statistical analyses were performed with the transformed data. A log₁₀ transformation of each

CFU count was performed to normalize the data before statistical evaluation due to the high range of bacterial numbers. Then, to determine viable bacteria counts, statistical analyses were performed using one-way ANOVA and the Fisher's least significance difference (LSD) post hoc test for pair-wise means comparisons. All statistical testing was performed using Sigma Stat® for Windows Software®, Version 3.5 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA), using a pre-set alpha of 0.05.

3. RESULTS

The Kruskal-Wallis test revealed a significant difference ($p < 0.005$) between microleakage means of experimental TFMs with ZM and the commercial reference. The mean scores and standard deviations are shown in Figure 1A. Z5 had significantly lower score than the control and the commercial TFM ($F^{\circledR}$) ($p < 0.005$), but it was not significantly different from Z0.5, Z1 and Z2. L had a significantly higher score than the experimental TFMs ($p = 0.029$).

The TFMs containing ZM in their formulations showed statistically greater water sorption than F and control ($p < 0.001$) (Fig. 1B). The TFM with highest concentration of ZM (Z5) absorbed more water.

For the solubility ($p < 0.001$), the experimental groups presented lesser solubility than $F^{\circledR}$, but no differences were observed between them (Fig. 1B). Table 1 shows the degree of conversion, depth of cure, dimensional alterations and cohesive strength of the TFMs. The percentage of degree of conversion (DC%) of TFMs with ZM are significantly higher than that of F ($p < 0.034$) (Table 1). The depth of cure ranged between 7.43 ± 0.4 mm of $F^{\circledR}$ to 15.43 ± 0.1 mm of TFM with ZM. It can be observed numerically greater depth cure in Z1 and Z2. However, all TFMs with ZM were statistically similar.

There was no statistically significant differences in dimensional changes between experimental TFMs tested, however the F had showed statistically less dimensional changes ($p = 0.016$). The addition of ZM also resulted in improved mean values of ultimate tensile strength of TFMs (Table 1). The Z4 and Z5 showed highest UTS than Z1, Z2 and Z3 ($p < 0.001$).

The Table 2 showed the shore hardness of the TFMs at different depths. There were no significant differences in the hardness of the specimens ($p = 0.878$). The results revealed that the mean hardness values were similar to different depth

cure ($p=0.080$), and there is not a statistically significant interaction between specimens and depth cure ($p=0.402$). The F was deleted from the calculations because of the pattern of absent data.

In the *S. mutans* UA159 biofilm accumulation test (Fig. 3), the F showed lower CFU/mg than all experimental TFMs ($p<0.001$). Regarding the direct contact test after 1h ($p<0.001$), the F showed lower antibacterial effect than Z0.5, Z1 and Z5, and the control was similar to Z2 (Fig 2A). After 24 h in direct contact test, all TFMs with ZM were statistically similar ($p=0.058$).

The results of the Cytotoxicity assay are represented in Figure 4. Z5 was moderately cytotoxic after 24h of exposure in DMEM, and statistically more cytotoxic than others ($p=0.044$). Conversely, Control (free ZM) was noncytotoxic, and other groups are slightly cytotoxic.

4. DISCUSSION

Temporary resin-based materials should have satisfactory mechanical properties to be accepted as a successful temporary material. Results obtained in this investigation indicated that TFMs with ZM gave good mechanical properties which were at the same level or superior of the properties of a commercial reference (F). The incorporation of ZM improved some properties such as ultimate tensile strength, water sorption and microleakage.

All materials containing ZM showed least microleakage. This property is effective to seal the edges of the tooth. Materials containing ZM showed highest water sorption. Furthermore, Z5 showed greatest water sorption and least microleakage. This is explained because the TFMs undergo polymerization shrinkage and after contact with water they swell. Furthermore, the highest hydrophilicity of TFMs with ZM is most probably due to the presence of the Zn^{+2} which form a network of Zn bonds and ZnOH into the polymer chains of the resin-based temporary material in the presence of water. In a more heterogeneous network the space created between the polymer clusters (microporous) is larger and accommodates a larger quantity of water (16).

In the DC test of the TFMs, no significant difference was observed between the control and the other groups containing ZM. The incorporation of ZM did not affect the DC, and these results are opposite to those found by Henn et al.(14), probably

due to the differences in the composition of the materials assessed in these studies. In our study, we used the exothane 8®. This component showed almost full polymerization, and according to Ferracane et al. (23), how greater the degree of conversion, higher the material's stability front to the hydrolysis degradation phenomena. This will probably generate a long-durable material with improved physical-mechanical properties.

The depth of cure depends on different factors including the irradiation energy, the wavelength and penetration of light into the materials. The amount and size of filler particles also affect this phenomenon. The incorporation of ZM into the materials showed no changes in depth of cure, probably because these materials present an important characteristic of transparency. Moreover, these results are different from those found by Henn et al. (14) and Hojati et al.(24) probably because Henn et al. incorporated more amounts of zinc methacrylate, Hojati et al. added zinc oxide nanofillers. Their results show a decrease of nearly half the depth of cure(24).

Another property observed is the hardness that was evaluated in different cure depths and showed similar results from 0.5 to 13mm of curing depth. The experimental materials showed that even providing a greater depth of cure 10 mm they keep their hardness. The UTS increased in TFMs containing ZM, and it may be explained for the higher degree conversion that improves some mechanical properties(25).

Dimensional changes of TFMs during and after setting are a source of concern for clinicians. It has been shown clinically that long term dimensional instability might lead to post-operative pain, tooth staining marginal breakdown of the restorations and fractured teeth. The dimensional stability of resin-based materials can be affected by polymerization shrinkage, thermal contraction and expansion and interaction with an aqueous oral environment (16). The release of oxygen and zinc ion offer antibacterial effect to the ZnO. The possible antimicrobial mechanism of ZnO occurs via the leaching of Zn^{2+} into the microbiological medium (26), inhibiting the active transport and metabolism of sugars as well as disrupting enzyme systems of dental biofilms by exchanging magnesium ions essential for enzymatic activity of the plaque (27). Zinc can also reduce acid production by *S. mutans* biofilms due to its ability to inhibit glucosyl transferase activity (28, 29). Probably the zinc methacrylate has similar mechanism of action.

In this study, the incorporation of zinc methacrylate in TFMs showed similar antibacterial effect to the control and enamel disks probably because the well-polished surfaces are few and slowly colonized by bacteria. Another point to consider is the fact that this is the first study that evaluates the zinc methacrylate in models of *S. mutans* biofilms. We know the biofilms are organized in communities of microorganisms coated with extracellular polysaccharides and are more resistant than planktonic bacteria. This could explain the effect of (10-30 wt%) zinc methacrylate in a planktonic model with *S. mutans* UA159(14).

The DCT is a test for evaluation of solid materials that have low soluble components. In DCT method, bacteria have a previous controlled direct contact with the desired material, and after that, the bacterial growth is quantified(21). In this study, we assessed two periods of exposure of TFMS against *E. faecalis*: period of 1 and 24 h. In Figure 3A, the results showed that TFMs can provide antibacterial effect against *E. faecalis* after 1 h of exposure at the different concentrations tested of Z0.5, Z1 and Z5. These results could not be compared with other studies because the zinc is functionality in methacrylate. After 24h, all groups were similar. Probably because its antimicrobial effect of the components of TFMs or because there was a greater bacterial growth which resulted in saturation of this ion in the media, and lack of nutrients causing the death of bacteria in the different groups tested. The antibacterial effects of Zn are known (26). However, in this study were not expected, probably due to the difficulty of the release of Zn ions, which could be supported by the data of degree of conversion and solubility.

For the cytotoxicity test, the Z5 showed less cells viability than all others groups. This could be explaining by the higher concentration of ZM. The zinc has shown to play an important role in the stimulation of bone cell functions when present in calcium phosphate compounds, such as hydroxyapatite and tricalcium phosphate (30). However in this study was used functionalized zinc.

The null hypothesis was partially accepted since the experimental material containing zinc methacrylate provided similar antibacterial effect in DCT assay. The DCT after 24h or biofilm accumulation test, all materials containing ZM presented similar effect to the control.

5. CONCLUSIONS

It was possible to obtain a composite-based TMF with elastomeric feature and better seal probably provided by increased water sorption as a compensatory feature regarding shrinkage of composite. In addition it was shown biocompatibility and an antibacterial effect in DCT against *E. faecalis*.

Acknowledgement

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the scholarship provided to the first author.

Conflict of Interest

The authors of this article express that they have no proprietary, financial, or other personal interest of any nature or kind in product, or company that is presented in this article.

REFERENCES

1. Aledrissy HI, Abubakr NH, Ahmed Yahia N, Eltayib Ibrahim Y. Coronal microleakage for readymade and hand mixed temporary filling materials. Iran Endodontic Journal. 2011;6(4):155-9.
2. Heling I, Gorfil C, Slutzky H, Kopolovic K, Zalkind M, Slutzky-Goldberg I. Endodontic failure caused by inadequate restorative procedures: Review and treatment recommendations. Journal of Prosthetic Dentistry. 2002;87(6):674-8.
3. Orstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial-infection during treatment of apical periodontitis - a pilot-study. International Endodontic Journal. 1991;24(1):1-7.
4. Pieper CM, Zanchi CH, Rodrigues-Junior SA, Moraes RR, Pontes LS, Bueno M. Sealing ability, water sorption, solubility and toothbrushing abrasion resistance of temporary filling materials. International Endodontic Journal. 2009;42(10):893-9.
5. Slutzky H, Slutzky-Goldberg I, Weiss EI, Matalon S. Antibacterial properties of temporary filling materials. Journal of Endodontics. 2006;32(3):214-7.
6. Naoum HJ, Chandler NP. Temporization for endodontics. International Endodontic Journal. 2002;35(12):964-78.

7. Ciftci A, Vardarli DA, Sonmez IS. Coronal microleakage of four endodontic temporary restorative materials: An in vitro study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*. 2009;108(4):E67-E70.
8. Carvalho RM, Pereira JC, Yoshiyama M, Pashley DH. A review of polymerization contraction: The influence of stress development versus stress relief. *Operative Dentistry*. 1996;21(1):17-24.
9. Deveaux E, Hildelbert P, Neut C, Boniface B, Romond C. Bacterial microleakage of cavit, irm, and term. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*. 1992;74(5):634-43.
10. Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dental Materials*. 2003;19(6):449-57.
11. Antonucci JM, Zeiger DN, Tang K, Lin-Gibson S, Fowler BO, Lin NJ. Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications. *Dental Materials*. 2012;28(2):219-28.
12. Cheng L, Weir MD, Xu HHK, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, et al. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dental Materials*. 2012;28(5):561-72.
13. Cheng L, Weir MD, Xu HHK, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, et al. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dental Materials*. 2012;28(5):573-83.
14. Henn S, Nedel F, de Carvalho RV, Lund RG, Cenci MS, Pereira-Cenci T, et al. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 2011;22(8):1797-802.
15. Henn S, de Carvalho RV, Ogliari FA, de Souza AP, Line SRP, da Silva AF, et al. Addition of zinc methacrylate in dental polymers: MMP-2 inhibition and ultimate tensile strength evaluation. *Clinical Oral Investigations*. 2012;16(2):531-6.
16. Sideridou ID, Karabela MM, Vouvoudi EC. Volumetric dimensional changes of dental light-cured dimethacrylate resins after sorption of water or ethanol. *Dental Materials*. 2008;24(8):1131-6.
17. Ogliari FA, de Sordi ML, Ceschi MA, Petzhold CL, Demarco FF, Piva E. 2,3-Epithiopropyl methacrylate as functionalized monomer in a dental adhesive. *Journal Dentistry*. 2006;34(7):472-7.
18. Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha M, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus (TM) and Epiphany (TM) root canal sealants. *International Endodontic Journal*. 2006;39(6):464-71.
19. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal Microbiology Methods*. 2001;44(2):121-9.
20. Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Research*. 2008;42(5):380-6.

21. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers by Modified Direct Contact Test Against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2009;35(7):1051-5.
22. Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*. 2006;23(1):17-22.
23. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dental Materials*. 2006;22(3):211-22.
24. Tavassoli Hojati S, Alaghemand H, Hamze F, Ahmadian Babaki F, Rajab-Nia R, Rezvani MB, et al. Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. *Dental Materials*. 2013;29(5):495-505.
25. Obici AC, Sinhoreti MAC, Frollini E, Sobrinho LC, Consani S. Degree of conversion and knoop hardness of Z250 composite using different photo-activation methods. *Polymer Testing*. 2005;24(7):814-8.
26. Aydin Sevinç B, Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. *Journal Biomedical Material Research B Applied Biomaterials*. 2010;94(1):22-31.
27. Devulapalle KS, Mooser G. Subsite specificity of the active site of glucosyltransferases from *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(16):11967-71.
28. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dental materials with antibiofilm properties. *Dental Materials*. 2014;30(2):e1-e16.
29. Wunder D, Bowen WH. Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. *Archives of Oral Biology*. 1999;44(3):203-14.
30. Courtheoux L, Lao J, Nedelec JM, Jallot E. Controlled bioactivity in zinc-doped sol-gel-derived binary bioactive glasses. *Journal of Physical Chemistry C*. 2008;112(35):13663-7.

Tables and Figures

Table 1. Mechanical properties of the different materials tested (Mean $\pm$ SD)

	Degree of conversion (%)	Depth of cure (mm)	Dimensional alterations (%)	Cohesive strength (MPa)
Control	96.46 $\pm$ 2.8a	15.23 $\pm$ 0.1ab	2.95 $\pm$ 0.1a	6.69 $\pm$ 1.6c
Z0.5	97.21 $\pm$ 1.8a	15.32 $\pm$ 0.2ab	3.10 $\pm$ 0.8a	8.16 $\pm$ 1.4c
Z1	97.33 $\pm$ 1.1a	15.43 $\pm$ 0.1a	2.33 $\pm$ 0.1a	10.5 $\pm$ 2.3b
Z2	98.56 $\pm$ 0.8a	15.41 $\pm$ 0.1a	2.90 $\pm$ 0.5a	13.2 $\pm$ 2.3a
Z5	97.55 $\pm$ 0.8a	14.86 $\pm$ 0.6a	3.31 $\pm$ 1.2a	13.9 $\pm$ 1.9a
F	27.59 $\pm$ 6.7b	7.43 $\pm$ 0.4b	1,07 $\pm$ 0,6b	9.58 $\pm$ 1.9b

Different lowercase letters indicate no statistically different means within each column. ($p < 0.05$).

Table 2. Hardness (Shore D Units) of TFMs with ZM in different cure depths(Mean $\pm$ SD)

	Control	Z0.5	Z1	Z2	Z5	F
0.5mm	46.50 $\pm$ 2.1	45.17 $\pm$ 2.2	48.67 $\pm$ 2.4	48.50 $\pm$ 2.4	48.00 $\pm$ 1.7	47,92 $\pm$ 3,2
5 mm	45.25 $\pm$ 1.4	46.83 $\pm$ 2.8	46.75 $\pm$ 2.7	49.00 $\pm$ 2.6	48.67 $\pm$ 1.1	45,33 $\pm$ 2,7
10 mm	45.92 $\pm$ 1.2	46.58 $\pm$ 1.7	47.92 $\pm$ 1.5	50.08 $\pm$ 1.2	49.08 $\pm$ 2.0	*
13 mm	42.00 $\pm$ 1.9	44.25 $\pm$ 2.9	47.83 $\pm$ 2.9	49.08 $\pm$ 2.3	47.17 $\pm$ 4.3	*

Different letters indicate statistically different ($p < 0.05$). *Depth cure minor.

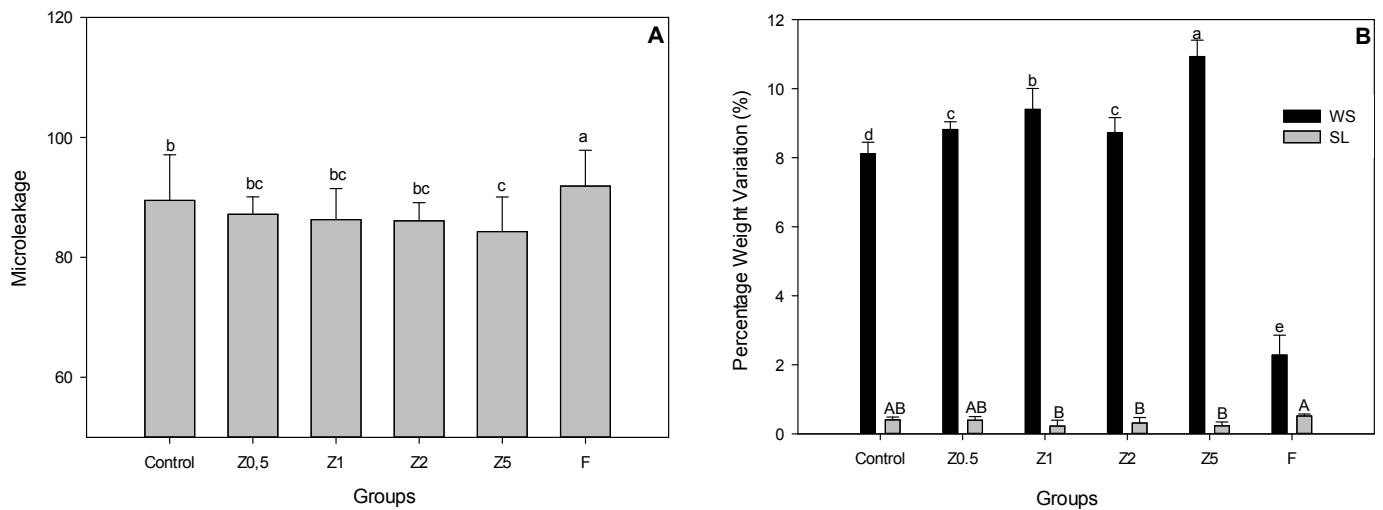


Figure 1. (A) Microleakage of TFMs after exposure to 1,000 cycles. (B) Water sorption and solubility expressed in %. Groups with similar letters have no significant differences ($p < 0.05$).

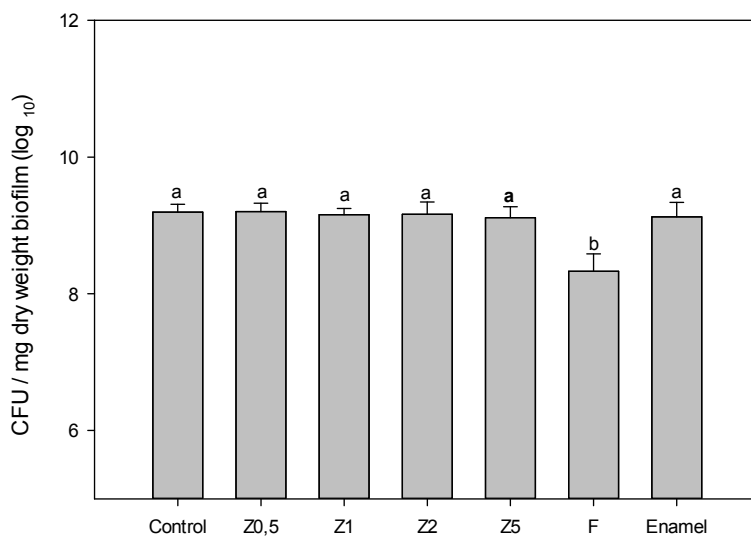


Figure 2. *S. mutans* UA159 accumulation after 3 days of biofilm formation under continuous exposure of 1% sucrose. Different letters represent differences statistically significant between groups ($p < 0.05$).

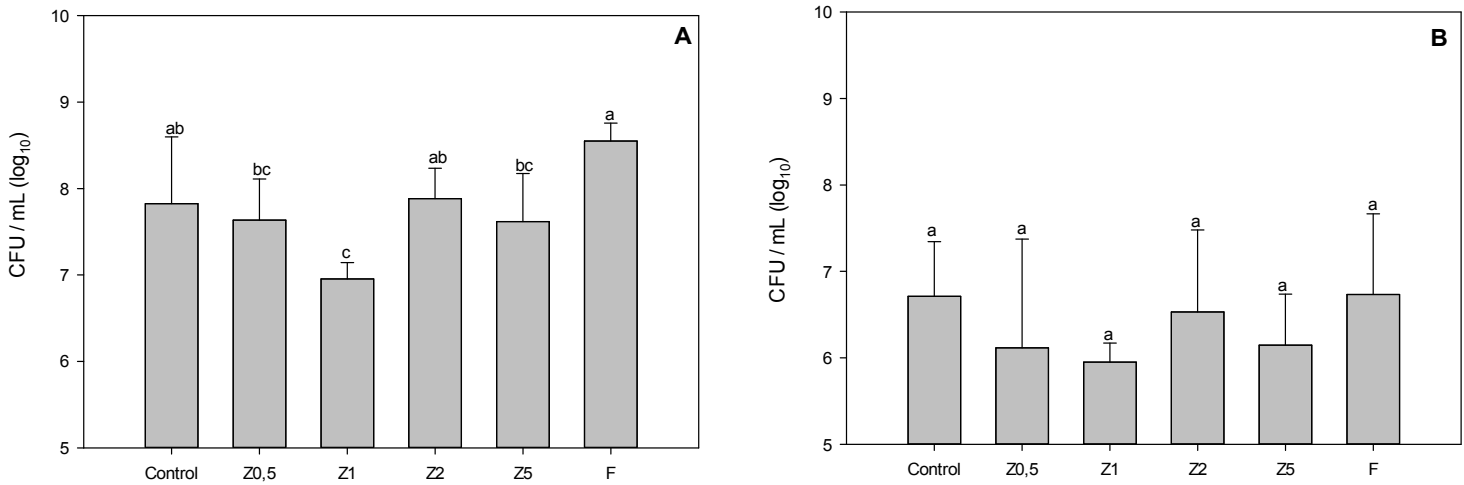


Figure 3. Survival of *E. faecalis* ATCC4083 after direct contact with temporary filling. Temporary filling for 1 h is represented in Fig. 3A. Temporary filling materials after 24 h in Fig. 3B. Different letters represent statistically significant differences between groups ($p < 0.05$).

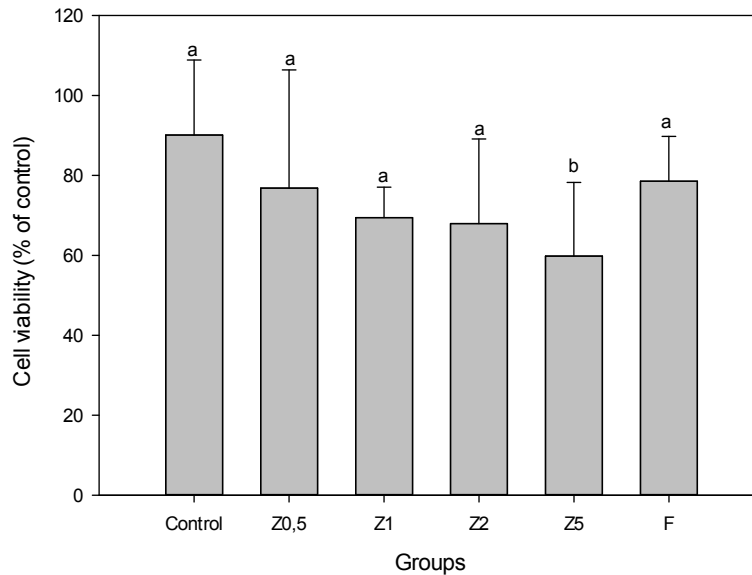


Figure 4. Cytotoxic effects after exposure to MTFs in L929 fibroblast cells. Results are expressed as mean and standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

6 Considerações finais

1)Embora exista uma diversidade de materiais restauradores temporários fotopolimerizáveis, os materiais comerciais testados no presente estudo apresentaram propriedades mecânicas similares, com exceção do Revotek LC. Estes materiais também revelaram algum efeito antibacteriano, embora na sua composição não haja nenhum antimicrobiano descriminado.

2)A incorporação de metacrilato de zinco nos materiais resinosos temporários não prejudicou as propriedades do material e algumas propriedades mecânicas como a microinfiltração, sorção de água e resistência coesiva foram até melhoradas. No entanto, não demonstrou efeito antibacteriano prolongado dos materiais em biofilmes de *S.mutans*, apenas em teste de contato direto com *E. faecalis*.

Referências

AIRES CP, DEL BEL CURY AA, TENUTA LM, KLEIN MI, KOO H, DUARTE S. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, n. 5, p. 380-6, 2008.

ALEDRISSY HI, ABUBAKR NH, AHMED YAHIA N, ELTAYIB IBRAHIM Y. Coronal microleakage for readymade and hand mixed temporary filling materials. **Iranian Endodontic Journal**, v.6, n. 4, p.155-9, 2011.

ANTONUCCI JM, ZEIGER DN, TANG K, LIN-GIBSON S, FOWLER BO, LIN NJ. Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications. **Dental Materials**, v. 28, n. 2, p.219-28, 2012.

AYDIN SEVINÇ B, HANLEY L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials**, v.94, n. 1, p. 22-31, 2010.

BEATTY MW, SWARTZ ML, MOORE BK, PHILLIPS RW, ROBERTS TA. Effect of cross-linking agent content, monomer functionality, and repeat unit chemistry on properties of unfilled resins. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 7, n. 3, p. 403-13, 1993.

BECKHAM BM, ANDERSON RW, MORRIS CF. An evaluation of three materials as barriers to coronal microleakage in endodontically treated teeth. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 8, p. 388-91, 1993.

BITENCOURT, P.M.R.; BRITTO, M.L.B.; NABESHIMA, C.K. Evaluation of sealing ability of two temporary resin-based cements used in Endodontics. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**. v.3, n.7, p.269-74, 2010.

CARVALHO RM, PEREIRA JC, YOSHIYAMA M, PASHLEY DH. A review of polymerization contraction: The influence of stress development versus stress relief. **Operative Dentistry**, v. 21, n. 1, p.17-24, 1996.

CHENG L, WEIR MD, XU HHK, ANTONUCCI JM, KRAIGSLY AM, LIN NJ. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. **Dental Materials**, v. 28, n. 5, p. 561-72, 2012.

CHENG L, WEIR MD, XU HHK, KRAIGSLEY AM, LIN NJ, LIN-GIBSON S. Antibacterial and physical properties of calcium–phosphate and calcium–fluoride nanocomposites with chlorhexidine. **Dental Materials**, v.28, n. 5, p. 573-83, 2012.

CHOHAYEB, A. A.; BASSIOUNY, M. A. Sealing ability of intermediate restoratives used in endodontics. **Journal of Endodontics**, v. 11, n.6, p. 241-4, 1985.

CIFTCI A, VARDARLI DA, SONMEZ IS. Coronal microleakage of four endodontic temporary restorative materials: An in vitro study. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 108, n. 4, p. E67-E70, 2009.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v.41, n.2-3, p.321-32, 1976.

DAUGELA, P.; OZIUNAS, R.; ZEKONIS, G. Antibacterial potential of contemporary dental luting cements, **Stomatologija**, v.10, p.16-21, 2008.

DE CASTRO PH, PEREIRA JV, SPONCHIADO EC, MARQUES AA, GARCIA LAF. Evaluation of marginal leakage of different temporary restorative materials in Endodontics. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 4, n. 4, 472-5, 2013.

DE SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dental Materials**, v. 16, p.103–108, 2000.

DEVEAUX, E.; HILDELBERT, P.; NEUT, C.; BONIFACE, B.; ROMOND, C. Bacterial microleakage of cavit, IRM, and TERM. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v. 74, n.5, p. 634-43, 1992.

DEVEAUX, E.; HILDELBERT, P.; NEUT, C.; ROMOND, C. Bacterial microleakage of Cavit, IRM, TERM, and Fermit: A 21-day in vitro study. **Journal of Endodontics**, v.25, p.653–9, 1999.

DEVULAPALLE KS, MOOSER G. Subsite specificity of the active site of glucosyltransferases from *Streptococcus sobrinus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n.16, p.11967-71, 1994.

ELY C, SCHNEIDER LFJ, OGLIARI FA, SCHMITT CC, CORREA IC, LIMA GDS. Polymerization kinetics and reactivity of alternative initiators systems for use in light-activated dental resins. **Dental Materials**, v. 28, n. 12, p.1199-206, 2012.

FERNANDEZ, M.R.; CARVALHO, R.V.; OGLIARI,F.A.; BEIRA, F.A.; A. ETGES, A.; BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with

bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth, **International Endodontic Journal**, v.43, p.102-108, 2010.

FERRACANE JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. **Dental Materials**, v. 22, n. 3, p. 211-22, 2006.

FILOCHE, S.K.; SOMA, K.J.; SISSONS, C.H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n 2, p. 73-9, 2007.

HELING I, GORFIL C, SLUTZKY H, KOPOLOVIC K, ZALKIND M, SLUTZKY-GOLDBERG I. Endodontic failure caused by inadequate restorative procedures: Review and treatment recommendations. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 87, n. 6, p. 674-8, 2002.

HENN, S.; NEDEL, F., CARVALHO, R.V.; LUND, R.G.; CENCI, M.S. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.22, n.8, p.1797-1802, 2011.

HERIGSTAD B, HAMILTON M, HEERSINK J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121-9, 2001.

IMAZATO S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. **Dental Materials**, v. 19, n. 6, p. 449-57, 2003.

International Standards Organization. Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: Switzerland, p. 10993–5, 1997.
ISO 4049, Dentistry-Polymer-based filling, restorative and luting materials, 2000.

KAMPFER, J.; GÖHRING, T.N.; ATTIN, T.; ZEHNDER, M. Leakage of food-borne *Enterococcus faecalis* through temporary fillings in a simulated oral environment. **International Endodontic Journal**, v.6, n.40, p.471-7, 2007.

KASTEN, F. H. Robert Feulgen and his histochemical reaction for DNA. **Biotechnic and Histochemistry**, v.78, n.1, p.45-9, 2003.

KOAGEL, S.O.; MINES, P.; APICELLA, M.; SWEET, M. In vitro study to compare the coronal microleakage of Tempit UltraF, Tempit, IRM, and Cavit by using the fluid transport model. **Journal of Endodontics**, v.4, n.34, p.442-4, 2008.

LI, F.; CHAI, ZG.; SUN, MN.; WANG, F.; MA, S.; ZHANG, L.; FANG, M.; CHEN, JH. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. **Journal of Dental Research**, v.4, p.372, 2009.

MALACARNE, J.; CARVALHO, R.M.; de GOES, M.F.; SVIZERO, N.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; YIU, C.K.; CARRILHO, M. **Dental Materials**, v.2, p. 973-980, 2006.

MARCZUK-KOLADA, G.; JAKONIUK, P.; MYSTKOWSKA, J.; LUCZAJ-CEPOWICZ, E.; WASZKIEL, D.; DABROWSKI, J. R.; LESZCZYNSKA, K. Fluoride release and antibacterial activity of selected dental materials. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, v. 60, p. 416–420, 2006.

MATALON S, SLUTZKY H, WEISS EI. Surface antibacterial properties of packable resin composites: Part I. **Quintessence International**, v. 35, n. 3, p. 189-93, 2004.

MAYER T, EICKHOLZ P. Microleakage of temporary restorations after thermocycling and mechanical loading. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 5, p. 320-2, 1997.

MOHAMMADI Z, SHALAVI S. Clinical applications of glass ionomers in endodontics: a review. **International Dental Journal**, v. 62, n. 5, p. 244-50, 2012.

MORAES, R.R.; CORRER-SOBRINHO L.; SINHORETI, MA.; PUPPIN-RONTANI, RM.; OGLIARI, F.A.; PIVA, E. Light-activation of resin cement through ceramic: relationship between irradiance intensity and bond strength to dentin. **Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials**, v.1, p.160-5, 2008.

MORAES RR, GONCALVES LS, LANCELLOTTI AC, CONSANI S, CORRER-SOBRINHO L, SINHORETI MA. Nanohybrid Resin Composites: Nanofiller Loaded Materials or Traditional Microhybrid Resins? **Operative Dentistry**, v. 34, n. 5, p. 551-7, 2009.

NAOUM HJ, CHANDLER NP. Temporization for endodontics. **International Endodontic Journal**. v. 35, n. 12, p. 964-78, 2002.

NIU, L. N.; FANG, M.; JIAO, K.; TANG, L. H.; XIAO, Y. H.; SHEN, L. J.; CHEN, J. H. Tetrapod-like zinc oxide whisker enhancement of resin composite. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 746–750, 2010.

NOGUERA, A.P.; McDONALD, N.J. A comparative in vitro coronal microleakage study of new endodontic restorative materials. **Journal of Endodontics**, v.16, n.11, p. 523-7, 1990.

ORSTAVIK D, KEREKES K, MOLVEN O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial-infection during treatment of apical periodontitis - a pilot-study. **International Endodontic Journal**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 1991.

PERALTA SL, CARVALHO PHA, VAN DE SANDE FH, PEREIRA CMP, PIVA E, LUND RG. Self-etching dental adhesive containing a natural essential oil: anti-biofouling performance and mechanical properties. **Biofouling**, v. 29, n. 4, p. 345-55, 2013.

PIEPER, C.M.; ZANCHI, CH.; RODRIGUES-JUNIOR, S.A.; MORAES, R.R.; PONTES, L.S.; Bueno, M. Sealing ability, water sorption, solubility and toothbrushing abrasion resistance of temporary filling materials. **International Endodontic Journal**. v.10, n.42, p.893-9, 2009.

SANTOS, M. C.; DE SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; TREVILATTO, P. C.; SCAREL-CAMINAGA, R. M.; LINE, S. R. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 31, p. 660–664, 2004.

SANTOS, M. C.; SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; TABCHOURY, C. M.; LINE, S. R. Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 145, p. 854-855, 2001.

SCHILLINBURG Jr., H.T. et al. Restaurações provisórias. In: SCHILLINBURG Jr., H. T. et al. Fundamentos de prótese fixa. São Paulo: Quintessence, 1998, cap. 15, p. 183-208.

SCHWARTZ, R.S.; FRANSMAN, R. Adhesive dentistry and endodontics: materials, clinical strategies and procedures for restoration of access cavities: a review. **Journal of Endodontics**, v.31, n.3, p. 151-65, 2005.

SLUTZKY H, SLUTZKY-GOLDBERG I, WEISS EI, MATALON S. Antibacterial properties of temporary filling materials. **Journal of Endodontics**, v. 32, n.3, p. 214-7, 2006.

SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. **Biomaterials**, p. 22, v. 2025–2030, 2001.
SPENCER, C. G.; CAMPBELL, P. M.; BUSCHANG, P. H.; CAI, J.; HONEYMAN, A. L. Antimicrobial effects of zinc oxide in an orthodontic bonding agent. **Angle Orthodontics**, v. 79, p. 317–322, 2009.

STANSBURY JW, DICKENS SH. Determination of double bond conversion in dental resins by near infrared spectroscopy. **Dental Materials**, v.17, n. 1, p. 71-9, 2001.

STUART CH, SCHWARTZ SA, BEESON TJ, OWATZ CB. Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 93-8, 2006.

TAVASSOLI HOJATI S, ALAGHEMAND H, HAMZE F, AHMADIAN BABAKI F, RAJAB-NIA R, REZVANI MB. Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. **Dental Materials**, v. 29, n. 5, p. 495-505, 2013.

TORABINEJAD, M.; UNG, B., KETTERING, J. D. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. **Journal of endodontics**, v. 16, p. 566-9, 1990.

THURNHEER, T.; GMÜR, R.; SHAPIRO, S.; GUGGENHEIM, B. **Applied Environmental Microbiology**. v, 69, n.3, p.1702-9, 2003.

URANGA, A.; BLUM, J.Y.; ESBER, S.; PARAHY, E.; PRADO, C. **Journal of Endodontics**. v. 25, n. 3, p.178-80, 1999.

WANG Z, SHEN Y, HAAPASALO M. Dental materials with antibiofilm properties. **Dental Materials**, v. 30, n. 2, p. e1-e16, 2014.

WEISS EI, SHALHAV M, FUSS Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. **Endodontics & Dental Traumatology**, v. 12, n. 4, p. 179-84, 1996.

WIDERMAN, F. H.; EANES, W. B.; SERENE, T. P. The physical and biologic properties of Cavit. **Journal of the American Dental Association**, v.82, n.2, p. 378-82, 1971.

WIEGAND, A.; BUCHALLA, W.; ATTIN, T. Review on fluoride-releasing restorative materials—fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. **Dental Materials**, v. 23, p. 343–62, 2007.

WUNDER D, BOWEN WH. Action of agents on glucosyltransferases from Streptococcus mutans in solution and adsorbed to experimental pellicle. **Archives of Oral Biology**, v. 44, n. 3, p. 203-14, 1999.

ZHANG H, SHEN Y, RUSE ND, HAAPASALO M. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers by Modified Direct Contact Test Against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 7, p. 1051-5, 2009.