

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE

XXI CICLO (2006-2008)

**POLIMERIZZAZIONE, RILASCIO E CITOTOSSICITA'  
DEI MATERIALI DENTARI A BASE DI RESINA**

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. ANTONIO MUTTI

Tutor:  
Prof.ssa MARIA LUISA TANZI

Dottorando:  
MOHAMED SHATEL

*"Diseases are crises of purification, of toxic elimination."  
Hypocrites, 500 BC*

# INDICE

<b>1. RIASSUNTO</b> .....	I
<b>2. INTRODUZIONE</b> .....	1
2.1. ODONTOIATRIA CONSERVATIVA.....	2
2.2. RESINE COMPOSITE.....	4
2.2.1 COMPOSIZIONE.....	8
2.2.1.1. <i>Fase organica</i> .....	8
2.2.1.2. <i>Fase inorganica</i> .....	12
2.2.1.3. <i>Fase intermedia</i> .....	17
2.2.2. CLASSIFICAZIONE.....	20
2.2.3. PROPRIETÀ DELLE RESINE COMPOSITE.....	25
2.2.4. CAMPO DI APPLICAZIONE DELLE RESINE COMPOSITE....	27
<b>3. POLIMERIZZAZIONE</b> .....	29
3.1. REAZIONE DA POLIMERIZZAZIONE.....	30
3.1.1. <i>Autopolimerizzazione</i> .....	32
3.1.2. <i>Fotopolimerizzazione</i> .....	32
3.1.3. <i>Fotoiniziatori</i> .....	34
3.2. LAMPADE PER POLIMERIZZAZIONE.....	35
<b>4. CITOTOSSICITA' E RILASCIO</b> .....	38
4.1. GRADO DI CONVERSIONE.....	42
4.2. CONTRAZIONE DA POLIMERIZZAZIONE.....	44
<b>5. SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	46
<b>6. MATERIALI E METODI</b> .....	50
6.1. PREPAZIONE DEI CAMPIONI.....	51
6.2. COLTURE CELLULARE.....	52
6.3. REAZIONE DI CITOTOSSICITÀ.....	53

6.4. SAGGIO DI VITALITA' (MTT assay).....	54
6.5. MICROSCOPIO CONFOCALE A FLUORESCENZA.....	55
6.6. MISURAZIONE DELLA CONTRAZIONE.....	56
<b>7. RISULTATI e DISCUSSIONI.....</b>	<b>58</b>
7.1. REAZIONE MACROSCOPICA DIRETTA.....	59
7.2. REAZIONE DI LISI.....	59
7.3. MICROSTRUTTURA E RILASCIO.....	61
7.4. MISURA DI VITALITA'.....	62
7.5. VARIAZIONE DIMENSIONALE.....	67
<b>8. CONCLUSIONI.....</b>	<b>70</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>74</b>
<b>10. FIGURE e TABELLE.....</b>	<b>92</b>
<b>11. ALLEGATO I.....</b>	<b>I</b>
<b>12. ALLEGATO II.....</b>	<b>II</b>

## **1. RIASSUNTO**

## **RIASSUNTO:**

Un materiale da otturazione ideale dovrebbe garantire una stabilità chimica e una facilità d'uso, ed essere biocompatibile. Nelle resine composite per uso odontoiatrico sono presenti monomeri metilacrilici come il Bis-fenolo A glicidilmetacrilato (Bis-GMA) considerato citotossico se rilasciato. Nel presente lavoro di tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze della Prevenzione, è stato valutato (*in vitro*) l'effetto del rilascio di sei materiali compositi a base di resina in ambiente acquoso sulle cellule fibroblasti L-929. E' stata vista la macroreazione dei fibroblasti all'esposizione diretta dei campioni in funzione del grado di conversione polimerica. E' stata osservata mediante microscopia ottica la reazione di lisi. Si è calcolata e confrontata la citotossicità di matrici polimeriche con frazioni differenti di monomeri non polimerizzati. Considerato che la frazione di monomeri non polimerizzata non è uniformemente distribuita nella matrice, si è identificata l'origine principale dei monomeri citotossici rilasciati. Per questa identificazione si è utilizzata la microscopia confocale a fluorescenza. I risultati ottenuti confermano che la superficie esterna di tutti i materiali è citotossica. .Eliminata la parte esterna, la continuità dell'azione citotossica del materiale massivo è principalmente dovuta a rilascio dall'interno della porosità, da parte di pori interconnessi con l'ambiente acquoso.

**Parole Chiavi:** citotossicità, polimerizzazione, monomeri residui, microscopio confocale fluorescente, compositi, compomeri, adesivi dentali, rilascio, porosità, materiali da restauro.

## **ABSTRACT:**

Un ideal dental filling material should guarantee a chemical stability and a facility of use, and to be biocompatible. In modern dentistry, the composite resin contains methacrylic monomers as (Bis-GMA) Bis-phenol Glycidyl Methacrylate. In the present thesis of Doctorate of Research in Sciences of the Prevention, it has been valuated (in vitro) the effect of six resin-based materials in aqueous environment using fibroblasts L-929. Has been observed the macroreaction of cell-line of fibroblasts when exposed directly to the samples as a function of degree of polymerization conversion. Reaction of lysis has been observed by optical microscopy. The cytotoxicity of bulk material was calculated and compared with the different fraction of non polymerized monomers and is not evenly distributed into the matrix. Using confocale fluorescent microscopy has been identified the main source of released cytotoxic monomers. The obtained results confirm that the surface layers of all materials are cytotoxic, and the prolonged cytotoxic effect noted when surface layer was removed is due to the porosity in the bulk material interconnected with the aqueous environment.

**Key words:** cytotoxicity, polymerization, residual monomers, confocale fluorescent microscopy, composites, compomers, dentinal adhesives, release, porosity, restorative materials.

## **2. INTRODUZIONE**

## 2.1. ODONTOIATRIA CONSERVATIVA

L'odontoiatria conservativa è una branca della Restaurativa che si occupa della cura dei denti cariati, delle procedure per l'eliminazione della carie e di quelle relative alla chiusura delle cavità risultanti dall'eliminazione dello smalto e della dentina cariata, tramite l'utilizzo di appositi materiali.

Le carie possono essere superficiali o profonde. Nel primo caso ci si limita ad asportare parte della dentina e dello smalto interessati dalla carie, otturando il dente con appositi materiali (amalgama d'argento o compositi). L'uso dell'amalgama d'argento, è stato sostituito ormai dai materiali compositi che per le loro caratteristiche adesive permettono una preparazione della cavità cariosa meno ampia rispetto all'uso dell'amalgama (Vimy *et al.* 1990), che richiedeva cavità dalle caratteristiche particolari perché fossero ritentive. Inoltre il colore metallico del restauro si presenta molto diverso dal colore naturale del dente integro, (Fullc A. 1993) determinando una zona facilmente individuabile anche all'occhio meno esperto. (Figure, 1,2) e esteticamente non accettabile.

L'evoluzione dei materiali dentari, intesa come miglioramento delle loro caratteristiche fisico-chimiche e della loro biocompatibilità, e il progredire delle tecniche operative, ha permesso l'odontoiatria di oltrepassare i suoi scopi preventivi, curativi e riabilitativi, ponendo in tal modo l'operatore in grado di focalizzare parte della sua attenzione sull'aspetto estetico insito nell'atto restaurativo.

Lo sviluppo merceologico dei nuovi materiali permette trattamenti il cui risultato finale oltre a essere curativo è anche valido dal punto di vista estetico.

Soprattutto oggi giorno, che viviamo in una società nella quale l'aspetto estetico è fondamentale, l'estetica ha assunto un ruolo primario anche in campo odontoiatrico, ed è per questo che materiali come l'oro, le leghe auree e gli amalgami d'argento pur soddisfacendo in modo ottimale i requisiti fisico meccanici richiesti a un materiale restaurativo, sono stati progressivamente sostituiti da materiali definiti "estetici" come le resine composite, compomeri e i vetroionomeri (GICs).

## 2.2. RESINE COMPOSITE

L'introduzione dei "materiali restaurativi estetici", quali le Resine Composite e le Ceramiche dentali, la loro evoluzione e la realizzazione di nuove procedure cliniche e applicative destinate alla loro utilizzazione, hanno reso possibile l'esecuzione di restauri che possono essere definiti estetici in quanto vengono ad armonizzarsi con il naturale aspetto degli altri elementi dentali grazie alla possibilità di imitazione del colore, dell'aspetto superficiale e della traslucenza dei denti naturali.

A fronte di questo grande vantaggio estetico, i materiali compositi a differenza dell'amalgama d'argento presentano una difficoltà tecnica maggiore nel conseguimento di un buon sigillo marginale. (Ferracane J. 1992)

Nel 1878, in Inghilterra viene brevettato il "cemento traslucido di Fletcher", capostipite dei prodotti "estetici" per restauri diretti. Questo ha rappresentato la base per i miglioramenti successivi (Grandini R. *et al.* 2004).

Lo sviluppo dei materiali compositi per il restauro dentale ha inizio intorno agli anni '50 con l'introduzione del

polimero Poli-Metil-MetAcrilato (PMMA) (Buonocore 1955) (Figura 4).

L'evoluzione di questi materiali resinosi, però, in linea con le continue e diverse esigenze degli odontoiatri e dei pazienti e con le migliorate tecniche di produzione industriale, ha determinato nei successivi 50 anni la definizione di materiali da restauro dentale con proprietà fisico-chimiche tra cui, in particolare, resistenza all'usura, stabilità dimensionale, estetica, lucidabilità e maneggevolezza, estremamente innovative.

È necessario precisare che il termine "composito" si riferisce genericamente ad una combinazione tridimensionale di almeno due materiali, chimicamente diversi, con una distinta interfaccia che separa i due componenti.

Un materiale composito è, nella sua accezione più generale, qualunque tipo di materiale non presente in natura, caratterizzato da una struttura non omogenea, costituita dall'insieme di due o più sostanze diverse, fisicamente separate da un'interfaccia e dotate di proprietà differenti. I singoli materiali che formano i compositi sono chiamati costituenti, : matrice e rinforzante o filler.

Il rinforzante è solitamente un materiale ceramico polverizzato disperso nella matrice resinosa di solito molto più duro e dà al composito le caratteristiche meccaniche principali. La matrice, costituita da una fase disperdente di una miscela di monomeri, mantiene le particelle rinforzanti (fase dispersa) in posizione fissa, esercitando la funzione di trasferimento dei carichi dal rinforzante alla struttura dentale. La combinazione così ottenuta matrice resinosa/particelle disperse di rinforzante vanta proprietà chimica fisica non riscontrabili nei singoli materiali che la compongono. Queste proprietà, possono essere variate scegliendo un diverso rapporto stechiometrico fase organica/rinforzante ( Bowen R. *et al.* 1992).

Dal punto di vista odontoiatrico, si tratta di materiali costituiti da resine organiche riempite con un *filler* chimicamente inerte di tipo ceramico. È proprio questo riempitivo che apporta al prodotto finale quelle proprietà fisiche più apprezzate nell'attività clinica (durezza, resistenza all'usura, resistenza alla frattura) (Kaine *et al.* 2004).

I materiali di ultima generazione, ottimizzati nella loro composizione, hanno superato quei limiti riscontrati

precedentemente (Shoba *et al.* 1997): la ridotta infiltrazione di fluidi orali, indotta da un miglior sigillo marginale, e le migliorate proprietà meccaniche rendono questi materiali competitivi agli amalgami dentali anche per denti posteriori.

In commercio, il materiale composito viene confezionato in siringhe per facilitare la manipolazione( Figura 5).

Per comprendere la problematica associata alla biocompatibilità di questi materiali, è necessario sottolineare alcuni aspetti della chimica di questi biopolimeri.

### 2.2.1. COMPOSIZIONE

Nelle resine composite dentali distinguiamo tre fasi:

- Una *fase inorganica*, costituita da riempitivi (rinforzanti) a base di polvere di ossido di silicio e alluminosilicati, che conferisce proprietà meccaniche ottimali;
- Una *fase organica*, costituita da una miscela di resine polimerizzabile, che costituisce il contenitore del rinforzante.
- Una *fase intermedia*, non sempre presente costituita da un agente legante all'interfaccia matrice/riempitivo.

#### 2.2.1.1. Fase organica (*la matrice*)

La matrice nei compositi dentali costituisce la fase organica disperdente, vale a dire la porzione del materiale che circonda tra loro le particelle di riempitivo. È questa che, dopo una reazione di polimerizzazione, determina il *setting*, ossia l'indurimento, dell'intero materiale.

La *resina di base* è rappresentata generalmente dal Bis-GMA, un monomero viscoso ad alto peso molecolare ottenuto da Bowen (1957) mediante la reazione tra Bisfenolo A e due molecole di Glicidil-MetAcrilato (GMA). Il risultato è un composto innovativo che mostrava, rispetto

alle classiche resine acriliche non modificate, la possibilità di una reticolazione tridimensionale (grazie alla presenza di due gruppi metacrilici), una minore contrazione da polimerizzazione, buone proprietà meccaniche (durezza, resistenza alla trazione e all'usura) grazie ai gruppi aromatici, maggiore idrofilia grazie ai legami idrogeno generati dai gruppi idrossilici della molecola, ma anche maggiore assorbimento d'acqua nel tempo.

Col termine monomero (dal greco *una parte*) in chimica si definisce una molecola semplice dotata di gruppi funzionali tali per cui sia in grado di combinarsi con altri monomeri e radicali formando macromolecole (polimeri).

Per estensione, il termine viene usato anche per identificare l'unità strutturale ripetitiva che forma un polimero. Il processo di trasformazione del monomero a polimero si chiama polimerizzazione. Nella Figura 6 sono riportate le formule strutturali dei monomeri più utilizzati.

Il Bis-GMA forma, tuttavia, una macromolecola molto rigida e viscosa. In alcuni casi, pertanto, al tradizionale Bis-GMA viene preferito, quale resina di base della matrice,

l'UDMA (uretano dimetacrilato), solo o associato con Bis-GMA e/o TEGDMA (Ruyter 1985).

L'assenza di gruppi aromatici (sostituiti da quelli NH) rende la molecola meno viscosa e meno rigida; l'assenza di gruppi OH ne riduce l'idrofilia e l'assorbimento di acqua, mentre i gruppi NH dovrebbero favorire l'adesione attraverso la formazione di legami idrogeno. Sono presenti, inoltre, all'interno di essa i *controllori di viscosità*, ossia monomeri a basso peso molecolare, utilizzati per diluire la resina di base e renderla più maneggevole e manipolabile e per garantire una maggiore incorporazione di riempitivo, una migliore mobilità molecolare durante la polimerizzazione e quindi un maggior grado di conversione. Tra tali monomeri ricordiamo il TEGDMA (trietilenglicole dimetacrilato), il più usato, l'UDMA (diUretan-Di-MetAcrilato), l'MMA (Metil-MetAcrilato) e altri manomeri di minor importanza e impiego quali il BIS-MA (metacrilato di bisfenolo A), l'EGDMA (EtilenGlicol-DiMetAcrilato).

Tali monomeri sono esattamente gli stessi contenuti all'interno delle resine fluide non riempite (*bonding*) dei correnti sistemi adesivi smalto-dentinali; ciò garantisce una

compatibilità ed un legame perfetto tra strato adesivo e materiale da restauro.

La presenza nella miscela organica di acrilati liofilizzati porta ad una diversa classe di materiali denominati compomeri, anche essi utilizzati nei restauri. Invece l'assenza di rinforzanti nella matrice resinosa diluita porta alla formazione di un'altra classe di materiali utilizzati come adesivi dentinali per lo smalto, i bond.

Altre molecole presenti nella fase organica sono gli *iniziatori o (catalizzatori) di polimerizzazione*, che hanno il compito di catalizzare la reazione di polimerizzazione decomponendosi e liberando radicali liberi altamente reattivi nel momento in cui vengono stimolati da una fonte di energia (calore, luce alogena, etc.).

Nei compositi autopolimerizzanti, l'iniziatore più diffuso è il perossido di benzoile. Nei compositi polimerizzati a luce UV (i primi foto-sensibili a essere stati introdotti), l'iniziatore della polimerizzazione era rappresentato dall'etere benzoil-alchilico, mentre per quelli polimerizzati a luce non-UV (praticamente la totalità dei materiali compositi presenti sul mercato) è generalmente il canforochinone (CQ). Lo spettro di assorbimento di questa

molecola è compreso tra 370-500 nm (Figura 7).

Facevano parte della fase organica anche gli *inibitori di polimerizzazione spontanea* (idrochinone fenol-derivati).

Essi hanno il compito di ritardare la reazione di polimerizzazione al momento della miscelazione delle due paste reagenti, così da permettere all'operatore di posizionare e modellare adeguatamente il composito. Aumenta dunque il tempo di lavoro, ma contemporaneamente hanno anche l'importante funzione di prevenire la polimerizzazione spontanea del materiale durante il suo stoccaggio.

#### **2.2.1.2. Fase inorganica (rinforzante)**

Rappresenta il riempitivo inorganico disperso nei compositi ed è costituito da minutissime particelle minerali incorporate nella matrice resinosa al fine di aumentarne le proprietà fisico-meccaniche, altrimenti insufficienti. Il controllo del riempitivo inorganico dei moderni compositi dentali rappresenta, inoltre, un ulteriore modo per poter moderare il fenomeno della contrazione da polimerizzazione (Dogon, 1990).

Le particelle di riempitivo (detto anche *carica* o *filler*) sono prodotte grazie ad un processo industriale di triturazione di vetro e ceramica fino a renderle di misura minima dell'ordine del micron.

Queste particelle inorganiche di natura ceramica disperse nella resina rendono il materiale resinoso clinicamente adatto a sostituire il tessuto dentale perduto (Glenn J. 1982)

- miglioramento delle proprietà meccaniche della resina: durezza, resistenza a compressione, trazione, frattura e usura.
- riduzione della contrazione da polimerizzazione.
- riduzione del coefficiente di espansione termica.
- abbassamento del grado di assorbimento d'acqua cui è esposta la resina nell'ambiente orale.
- la radiopacità dei filler facilita le diagnosi radiografiche (requisito obbligatoriamente richiesto dalla Specifica n. 27 di ANSI/ADA per l'accettazione del materiale (J Am Dent Assoc. 2003)).

La carica e le proprietà del composito sono influenzate notevolmente dal riempitivo inorganico. Nonostante sia impossibile giudicare la qualità di un composito basandosi su di un solo parametro, numerose ricerche dimostrano la

stretta correlazione esistente tra qualità (in percentuale) di carica e/o tipologia del riempitivo e diverse caratteristiche fisico-meccaniche dei compositi.

La maggior parte delle classificazioni proposte per i compositi dentali negli ultimi anni si basa sulle caratteristiche dimensionali e morfologiche del *filler*.

I filler più comunemente utilizzati sono:

\*biossido di silicio, in forma di quarzo cristallino o di silice pirogenica; il più impiegato in quanto superiore per estetica e qualità meccaniche.

\*silicato di litio e alluminio

\*vetro di boro

\*vetro di bario

Le dimensioni delle particelle possono variare tra 0.007-100  $\mu\text{m}$ , a seconda della procedura adottata per la lavorazione del riempitivo.

I riempitivi sono classificabili in base alle diverse loro caratteristiche: natura chimica, dimensioni e tecniche di produzione.

In base alla loro natura chimica, si distinguono due gruppi: particelle a base di biossido di silicio ( $\text{SiO}_2$ ), che in ragione delle caratteristiche del loro reticolo cristallino assumono

la forma di quarzo cristallino o di silice pirogenica, e particelle a composizione chimica più complessa (silicati di Al e Li, St e Al, Ba e Al; vetri di Ba, Zn, St; silicati di litio e alluminio; silicati di stronzio e alluminio; borosilicati; alluminosilicati di zirconio; fluoruro di calcio).

Le particelle a base di quarzo cristallino sono dure, chimicamente inerti, con basso coefficiente di espansione termica, buon rendimento estetico (per il buon indice di rifrazione); venivano usate generalmente quali macroriempitivi nei vecchi compositi macroriempiti. Le particelle a base di silice pirogenica sono piccole sfere sintetizzate chimicamente ad alta temperatura.

Non sono mancati i tentativi di associare alla matrice resinosa riempitivi in forma di fibra, soprattutto fibra di vetro (Willems *et al.* 1992), ma i risultati non sono stati eccezionali per i problemi legati alla differente capacità di legame con la matrice da parte di questi ultimi. Alcuni Autori (Kamposiora *et al.* 1996) hanno riferito promettenti risultati con l'uso di riempitivi a base di fibre ramificate, compositi cioè in cui ogni singola particella di riempitivo consiste in un ammasso poroso di fibre.

I riempitivi inorganici possono essere ottenuti in diversi modi (Grandini R. *et al.* 2004).

\* triturazione delle sostanze inorganiche;

\* precipitazione di silice pirogenica ad alte temperature;

\* prepolimerizzazione di silice colloidale monomero a bassa viscosità e successiva frantumazione della massa solidificata;

\* agglomerazione artificiale di granuli inorganici privi di resina.

Molto di recente sono inoltre state proposte particelle denominate *ceramic whiskers*, cioè particelle monocristalline nitrosilicee aghiformi, delle dimensioni medie di 0,4 - 5  $\mu\text{m}$ . La loro forma allungata sarebbe particolarmente vantaggiosa nel prevenire la propagazione di microcracks.

La loro resistenza alla compressione, con valori di circa 30 GPa, risulta di gran lunga superiore a quella delle particelle vetrose (0,1 GPa) e delle fibre (3 GPa), che peraltro sono amorfe e policristalline, a differenza dei *whiskers* che sono monocristallini (Drummond L. 2008).

Queste nuove particelle vengono legate alla matrice previa ossidazione e/o trattamento a 500°C con successiva

silanizzazione e mostrano una maggiore resistenza all'usura rispetto ai compositi contenenti i riempitivi tradizionali.

### **2.2.1.3. Fase intermedia (*agente legante*)**

Le particelle inorganiche del riempitivo non possono formare alcun tipo di legame chimico con le molecole polimeriche; affinché il riempitivo possa svolgere la sua funzione nella matrice resinosa è necessario che ci sia un intimo contatto tra le due fasi; tale contatto è garantito dall'agente legante ( Liu *et al.* 2001).

Presupposto essenziale per il corretto funzionamento di un restauro è che vi sia una perfetta compenetrazione e continuità fisico-meccanica tra le sue due fasi principali. Questo comporta una adesione la migliore possibile delle diverse fasi tra loro. È solo così, infatti, che le forze e gli stress che normalmente attraversano il materiale indurito possono distribuirsi in modo omogeneo passando indistintamente tra matrice e riempitivo senza vie preferenziali. In condizioni ideali la matrice, più duttile, trasferisce le tensioni al riempitivo che, essendo più rigido, si oppone alle deformazioni. In assenza di un valido legame matrice-riempitivo la conseguenza più immediata è che le

forze tenderebbero a concentrarsi all'interfaccia e si formerebbero rime di frattura con conseguente loro propagazione nelle resina che poi avranno vita facile a diffondersi di interfaccia ad interfaccia attraverso tutto il restauro.

Un saldo legame matrice-riempitivo rappresenta inoltre un presupposto indispensabile per evitare la penetrazione di molecole d'acqua (Ulman 1996) e la dissoluzione idrolitica del legame all'interfaccia, con conseguente discolorazione e indebolimento del manufatto (Plueddemann 1982; Grandini *et al.* 1999).

Una delle prime vie tentate è stata quella di un ancoraggio semplicemente micromeccanico della matrice alle microporosità delle particelle di riempitivo (Soderholm 1985), create appositamente sulla loro superficie oppure mediante sinterizzazione (Ehrnford 1983).

Il principale agente legante utilizzato già da Bowen (1982) nei primi compositi è il *silano*, un collante organico a base di silicio col quale vengono ricoperte le particelle inorganiche del riempitivo prima di essere inserite nella matrice. Quella dei silani è in realtà una famiglia di cui fanno parte una serie di molecole accomunate tutte dal fatto

di possedere un doppio gruppo funzionale: metacrilico da un lato, per legare i monomeri della matrice, silanico dall'altro, per legare le particelle di riempitivo.

La molecola attualmente di più largo uso è il metacrilossi-propiltrimetossisilano, caratterizzata da un gruppo metacrilico ( $-\text{CO}-\text{CCH}_3=\text{CH}_2$ ) a un'estremità della molecola e da tre gruppi trimetossilici [ $-\text{Si}-(\text{OCH}_3)_3$ ] all'altro capo (Figure 8 e 9).

L'ottenimento di una ricopertura ottimale da parte del silano è influenzata dalla geometria superficiale delle particelle di riempitivo e dall'eventuale presenza su di esse di impurità deposte durante le fasi di produzione (Johanson *et al.* 1967).

Una deposizione non ottimale dell'agente legante sul *filler* determinerebbe una ridotta resistenza all'usura (Powers *et al.* 1974). La silanizzazione non avrebbe influenza neanche sul modulo di elasticità del composito, secondo Sakaguchi (1999) e Ferracane (1999).

### 2.2.2. CLASSIFICAZIONE

Composizione chimica, modalità di polimerizzazione e caratteristiche del riempitivo rappresentano solo alcuni dei diversi parametri che consentono di distinguere tra loro i numerosi compositi oggi disponibili sul mercato, ognuno con proprietà meccaniche e indicazioni cliniche specifiche.

Nonostante esistano molte caratteristiche differenziali, la classificazione dei materiali compositi viene fatta generalmente in base alle dimensioni del riempitivo ed alla tecnica di fabbricazione.

In base alle dimensioni del riempitivo, (Swift *et al.* 1995) classificavano i compositi dentali in materiali costituiti da:

- megariempitivi: 2-0.5 mm; si tratta in pratica degli inserti di vetroceramica da annegare totalmente nel composito secondo tecniche recentemente proposte;
- macroriempitivi: 100-10  $\mu\text{m}$ ;
- medioriempitivi: 10-1  $\mu\text{m}$ ;
- miniriempitivi: 1-0,1  $\mu\text{m}$ ;
- microriempitivi: 0,1-0,01  $\mu\text{m}$ ;
- nanoriempitivi: 0,01-0,005  $\mu\text{m}$ , attualmente in fase avanzata di sperimentazione.

Gli stessi Autori, riclassificavano i materiali stessi anche in base alle tecniche di produzione dei compositi. Essi distinguevano tecniche per triturazione o per precipitazione, oppure per triturazione o vaporizzazione di particelle prepolimerizzate organico - inorganiche, oppure per conglomerazione mediante processo di sinterizzazione delle particelle di rinforzante.

Generalmente possiamo indicare le seguente classificazioni:

LUTZ F, SETCOS JC, PHILIPS RW, ROULET JF (1983)

**Classe I**, Compositi tradizionali: dimensioni medie particelle 2-12 micron,

**Classe II**, Compositi microriempiti: la dimensione media delle particelle è di 0,04 micron,

**Classe III**, Compositi resinosi a base di micro particelle.

\* Complessi micro- e prepolimerizzati reinseriti nella massa

\* Complessi microriempiti prepolimerizzati di forma sferica

\* Complessi agglomerati di microparticelle

**Classe IV**, Compositi ibridi: le dimensioni delle particelle sono 0,04-100 micron.

BRAEM M, LAMBRECHTS P, VANHERLE G. (1984)

- Tradizionali
  - \*Primitivi (5-30  $\mu\text{m}$ )
  - \*Recenti (1-5  $\mu\text{m}$ )
- Ibridi
  - \*3-10  $\mu\text{m}$
  - \* $\leq 2$   $\mu\text{m}$
- Miscellanei
  - \*Complessi prepolimerizzati
  - \*Complessi agglomerati
- Microriempiti
  - \*Omogenei
  - \*Non omogenei
    - Granulari Prepolimerizzati (1-200  $\mu\text{m}$ )
    - Sferici prepolimerizzati (5-50  $\mu\text{m}$ )
    - Agglomerati (1-25  $\mu\text{m}$ )

CRAIG (1985)

**Tipo I** Le particelle inorganiche vengono uniformemente disperse all'interno della matrice.

- \* Classe I. Particelle di grossa taglia (*macrosize*) 8-25  $\mu\text{m}$  (ottenute per triturazione).

\* Classe II. Particelle di piccola taglia (*minisize*) 1-8  $\mu\text{m}$   
(ottenute per triturazione)

\* Classe III. Microparticelle (*microsize*) 0,04-0,2  $\mu\text{m}$   
(ottenute per precipitazione).

\* Classe IV. Miscela di Classi I-III.

**Tipo II** Particelle prepolimerizzate contenenti microparticelle di silice colloidale disperse all'interno della matrice.

\* Classe I. Macroparticelle prepolimerizzate 1-200  $\mu\text{m}$ .

\* Classe II. Miscela del precedente (Tipo II - Classe I) con le Classi II e III del Tipo I.

ALBERS H. (1985)

- Compositi macroriempiti: la dimensione media delle particelle è di 0.6-15  $\mu\text{m}$ .
- Compositi micririempiti: la dimensione media delle particelle è di 0.04  $\mu\text{m}$ .
- Complessi agglomerati di microparticelle.
- Compositi ibridi.
- Compositi costituiti da particelle di taglia piccola: la dimensione media delle particelle è di 5  $\mu\text{m}$ .
- Compositi fortemente riempiti (con 80% di riempitivo).

WILLEMS G, LAMBRECHTS P, BRAEM M, CELIS JP,

VANHERLE G (1992)

- Compositi caricati
  - Medio-riempiti <60 vol%
    - Ultrafini < 3  $\mu\text{m}$
    - Fini > 3  $\mu\text{m}$
  - Compatti >60 vol%
    - Ultrafini < 3  $\mu\text{m}$
    - Fini > 3  $\mu\text{m}$
- Compositi microfini
  - Omogenei
  - Eterogenei
    - Particelle miste
    - Particelle agglomerate
    - Agglomerati sintetizzati
    - Particelle sferiche
- Compositi misti
- Compositi tradizionali
- Compositi rinforzati con fibre

I compositi possono essere classificati secondo il metodo di polimerizzazione; *Compositi auto- e fotopolimerizzabili.*

### **2.2.3. PROPRIETA' DELLE RESINE COMPOSITE**

Il composito ideale dovrebbe possedere tali requisiti:

#### 1- Praticita':

- \* facile scelta del colore;
- \* consistenza ottimale;
- \* limitata sensibilita' all'umidita' prima dell'indurimento;
- \* buona possibilita' di rifinitura;
- \* sensibilita' limitata alla luce.

#### 2- Requisiti clinici:

- \* stabilita' cromatica;
- \* buon adattamento cromatico a quello dei denti naturali;
- \* radiopacita':
- \* adattamento marginale buono;
- \* buona adesione al tessuto dentale;
- \* limitata ritenzione di placca .

#### 3- Buone proprieta' chimico-fisiche:

- \* buone proprieta' meccaniche;
- \* limitata solubilita';
- \* limitata espansione termica;
- \* limitata contrazione da polimerizzazione;
- \* grado di conversione elevato.

4-Biocompatibilita':

\* la resina composita dovrebbe avere una tossicità limitatissima.

I compositi attuali, nonostante gli enormi progressi, non sono ancora in grado di soddisfare tutte le suddette aspettative.

## **2.2.4. CAMPO DI APPLICAZIONE DELLE RESINE COMPOSITE**

Le resine composite non vengono usate solo per la restaurazione diretta, ma sono materiali estremamente versatili impiegati in quasi tutti gli ambiti dell'odontoiatria (Watts D.C., 1992):

- Restauri diretti in vari classe, nei settori anteriori e posteriori.
- Ricostruzione di incisivi fratturati o denti anteriori malformati.
- Ricopertura di difetti dello smalto.
- Restauro di abrasioni cervicali.
- Costruzione di monconi da rivestire con corone protesiche.
- Applicazione di veneer laminari sui denti anteriori, corone in ceramica.
- Cementazione di bande e attacchi ortodontici o mantenitori di spazio.
- Splintaggio di denti periodontalmente compromessi.
- Costruzione di provvisori immediate.
- Riparazione o ricostruzione di rivestimenti estetici.

- Cementazione adesiva di restauri in resina composita o ceramica integrale.
- Sigillatura di solchi e fessure, come mezzo preventivo di lesioni cariose.

### **3. POLIMERIZZAZIONE**

### **3.1. REAZIONE DA POLIMERIZZAZIONE**

Tutti i compositi induriscono in seguito ad una reazione di polimerizzazione che coinvolge i monomeri contenuti all'interno della matrice organica. La polimerizzazione è un processo attraverso il quale i monomeri liberi si legano reciprocamente fino a formare complessi macromolecolari denominati appunto polimeri. Il composito non polimerizzato forma una massa fluida viscosa che può essere inserita nella cavità dentaria e plasmata opportunamente secondo l'anatomia voluta, assumendo, solo dopo la polimerizzazione, le caratteristiche cromatiche e fisico-meccaniche finali. Una reazione di polimerizzazione ideale dovrebbe essere rapida (per motivi di praticità), completa (per ottenere proprietà ottimali del composito), uniforme (in tutta la massa del restauro), con uno stress nullo o ridotto all'interfaccia dente-restauro (Peutzfeldt 1997).

Nella poliaddizione delle resine composite sono individuabili tre stadi: (Cook W.D. 1983)

1. *Periodo di induzione* (Stadio iniziale): le molecole di iniziatore vengono decomposte dall'attivatore e i radicali che ne derivano sono responsabili, a loro volta, dell'attivazione di alcune molecole monomeriche tramite formazione dei primi complessi radicalici monomero/iniziatore.
2. *periodo di propagazione* (Stadio intermedio): la catena monomerica si allunga, in conseguenza del legame del monomero attivo con un monomero inattivo.
3. *Periodo di terminazione* (Stadio finale): due meccanismi consentano la disattivazione del radicale e quindi l'arresto dell'accrescimento della macromolecola polimerica
  - Accoppiamento di due diverse macromolecole radicaliche
  - Legame del radicale con un inibitore, aggiunto in piccole quantità alla miscela monomerica di base; esso evita anche la polimerizzazione precoce della resina in stoccaggio.

### **3.1.1. AUTOPOLIMERIZZAZIONE**

Nei compositi autopolimerizzanti, la reazione di polimerizzazione prendeva avvio solo dopo la miscelazione di due componenti distinti (pasta-pasta o liquido-pasta), all'interno dei quali erano contenuti separatamente gli iniziatori o catalizzatori (perossido di benzoile) e gli acceleratori di polimerizzazione (amine terziarie aromatiche).

### **3.1.2. FOTOPOLIMERIZZAZIONE**

Nei compositi fotopolimerizzabili, la reazione di polimerizzazione è innescata dalla luce visibile (VL). Questi materiali sono costituiti da un'unica pasta all'interno della quale il catalizzatore è già presente, ma diviene attivo solo dopo irraggiamento con una fonte luminosa di lunghezza d'onda compresa (Taira M. *et al.* 1988) generalmente entro un 400-470 nm.

Durante il tempo di attivazione un solo radicale può integrare nella rete polimerica fino a 50 monomeri (Stansbury J.W., 2000).

I compositi ad attivazione fotochimica sono i più usati perché presentano dei vantaggi rispetto ai compositi autoattivati:

- La polimerizzazione con un maggiore grado di conversione monomerica un composito con proprietà fisiche e chimiche che ne migliorano il comportamento clinico (Vankerckhoven H. *et al.* 1982)
- La reazione di polimerizzazione viene attivata nel momento in cui il composito viene esposto alla luce.
- Polimerizzazione in presenza d'aria, stabilisce un legame immediato tra uno strato di composito polimerizzato e il successivo (Ruyter E. 1981), rispettando in questo modo gli spessori massimi di penetrazione della luce nel mezzo viscoso ( 1-2 mm nei compositi attivati tramite luce UV; 3 mm se l'attivazione avviene tramite luce visibile (Salako O. *et al.* 1979, Ruyter E. *et al.* 1982).

### 3.1.3. FOTOINIZIATORI

I fotoiniziatori, una volta attivati, si decompongono dando origine a radicali liberi altamente reattivi che, entrando in contatto con le molecole circostanti (altri iniziatori e/o molecole di monomero), le attivano a loro volta. Molto schematicamente, ogni fotoiniziatore dà origine ad un nucleo di attivazione, da cui diffonde in maniera multicentrica la reazione a catena della polimerizzazione, estendendosi infine rapidamente a tutto il materiale. Il fotoiniziatore più diffuso è il canforochinone (CQ) che ha il massimo spettro di assorbimento attorno ai 468-470 nm, ma possono essere usati anche altri  $\alpha$  dichetoni, come il fenilpropanedione (PPD), che assorbe la luce a 410 nm e viene in certi casi preferito al CQ, che ha un colore giallastro e può dare fastidiosi effetti trasparenti nel restauro finale.

### 3.2. LAMPADINE PER POLIMERIZZAZIONE

I materiali dentari che induriscono mediante la luce sono sempre più numerosi, per cui sono sempre più usate le lampade fotopolimerizzanti (Figura 10) .

Materiali dentali inizialmente usati erano polimerizzati da luce ultravioletta di lunghezza d'onda fra 10 e 380 nanometri , mentre gli attuali materiali utilizzano lo spettro visibile (lunghezza d'onda fra 400 e 700 nm). Più precisamente è la luce all'estremità blu dello spettro visibile, vicino al limite blu - verde, quella utilizzata per indurire gli attuali materiali. Un filtro ottico speciale, installato fra la lampadina e il puntale a fibre ottiche, lascia filtrare solo le lunghezze d'onda comprese fra 400 e 520 nm, mentre quelle delle bande verde, gialla e rossa (520-700 nm) vengono eliminate perché inefficaci. Infatti lo spettro di assorbimento del più comune fotoiniziatore presente nei compositi, il canforochinone, sta nella banda di lunghezza d'onda fra 450 e 500 nm, con un picco di assorbimento a 470 nm (Figura 11) .

Per ottenere la fotopolimerizzazione occorre una certa intensità di energia luminosa ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) applicata per un determinato tempo. Si ritiene che per polimerizzare uno strato di composito di 1 mm in un secondo sia necessaria una quantità di energia  $16000 \text{ mW}/\text{cm}^2$ , ma è difficile disporre di una potenza così elevata nel cavo orale, per cui si può utilizzare una potenza luminosa inferiore per un tempo maggiore. Per esempio, si possono irradiare  $1000 \text{ mW}/\text{cm}^2$  per un tempo di 16 secondi; di conseguenza disponendo di una lampada che eroghi  $400 \text{ mW}/\text{cm}^2$  sarebbero necessari 40 secondi di esposizione. (Fowler *et al.* 1994). È sempre raccomandabile aumentare i tempi di irraggiamento al fine di evitare una polimerizzazione incompleta (Tate W. *et al.* 1999). Tuttavia tempi di irraggiamento superiori a 40, 60 secondi non incrementano più il grado di polimerizzazione se viene utilizzata una comune lampada alogena di  $400\text{-}600 \text{ mW}/\text{cm}^2$ .

Attraversando il materiale restaurativo la luce subisce un'attenuazione di intensità dipendente da vari fattori:

- 1) lo spessore del materiale;

2) la presenza di riempitivo e le dimensioni delle sue particelle;

3) il colore (le tinte più scure trasmettono meno luce);

4) il disegno della cavità;

5) la distanza tra estremità del puntale e superficie del materiale. Il clinico deve ricordare che l'apparente durezza superficiale del materiale può nascondere una polimerizzazione interna inadeguata (Burgess J,1999).

In commercio sono presenti diversi tipi di lampade polimerizzatrici con differenti potenze (Figura 10) :

- Lampada alogena
- Lampada al plasma
- Lampada L.E.D. (Light Emitting Diode).

La quantità di calore emessa da un apparecchio fotopolimerizzante dipende da numerose variabili: intensità luminosa, tempo di irraggiamento, natura della sorgente di luce, distanza del puntale dalla superficie del tessuto, ma soprattutto dall'efficienza del filtro nel selezionare le lunghezze d'onda utili escludendo quelle caloriche (Fano L. *et al.* 1998).

## **4. CITOTOSSICITA' E RILASCIO**

Si definisce citotossicità l'effetto di un agente di tipo chimico (una molecola), fisico (temperatura, radiazione o onda elettromagnetica) o biologico (una cellula del sistema immunitario) in grado di indurre danno ad una cellula. L'agente che induce tale danno viene spesso definito citotossina (Cohen J. 1993). Questi materiali a base di resine subiscono uno assorbimento dei liquidi nei i primi giorni dopo immersione in acqua o saliva (Small C. *et al.* 1998, Cattani *et al.* 1999, Akashi *et al.* 1999).

In tutte le reazioni di polimerizzazione la reazione chimica che trasforma monomeri in polimero non è mai totale. Nel migliore dei casi si arriva circa 80% dei monomeri viene trasformato. Per le sostenze tipo compositi, la frazione non polimerizzata può variare dal 25% al 60%. Questa trasformazione incompleta comporta, in situazioni cliniche, il rilascio di monomeri nella cavità orale e nei fluidi biologici, fenomeno che raggiunge la sua massima intensità nelle 24 ore seguenti il trattamento (Hansen 1983, Leung *et al.* 1985, Watts *et al.* 1986, Ferracane *et al.* 1990, Pilo *et al.* 1992).

La principale causa di citotossicità delle resine composite utilizzate in odontoiatria è costituita dai monomeri

metacrilici non trasformati (Quinlan A. *et al.* 2002). I monomeri che non entrano a far parte della struttura polimerica sono rilasciati dal materiale stesso nel cavo orale (Ferracane J. 1994, Michelsen V. *et al.* 2003, Munksgaard C. *et al.* 2000 ). La presenza di tali molecole può essere all'origine di una gran varietà di interazioni chimiche e biologiche, che possono esitare in un'inflammatione o nella morte cellulare, apoptosi e/o necrosi (Geurtsen *et al.* 1998, Schmalz 1998, Nicholzen *et al.* 2008).

Un vantaggio di una polimerizzazione ottimale è costituito dalla possibilità di ottenere la minima quantità possibile di rilascio da parte del materiale trattato ( Tong *et al.* 2005, Franza *et al.* 2003, Schmalz *et al.* 2005, e Bouillaguet *et al.* 2002).

Numerosi fattori possono influenzare il grado di conversione polimerica di una resina composita a parità di sorgente luminosa: la composizione chimica del monomero, la percentuale e le caratteristiche del riempitivo, il colore e la traslucenza della resina composita (Hanks *et al.* 1996).

Negli ultimi anni la biocompatibilità dei materiali dentari a base di resina è diventata una questione sempre importante. Secondo (Yoshii 1997) c'è una relazione evidente tra la struttura del monomero e la citotossicità.

Gli studi di coltura cellulare hanno dimostrato che i monomeri della resina sono citotossici a contatto diretto con cellule fibroblasti (Hanks *et al.* 1991, Schedle A. *et al.* 1998, Geurtsen W. 1998, Lai Y. *et al.* 2004, Thonemann B. *et al.* 2002, Becher R. *et al.* 2006, Souzaa P. 2006). Gli estratti del monomero Bis-GMA e il comonomero TEG-DMA, influenzano la fertilità dei topi femmine (Dramani *et al.* 2006). Inalazione dei particelle di resina composita (<10 $\mu$ m) può provocare una infiammazione cronica nel sistema respiratorio del coniglio (Goldberg B. *et al.* 1992, Reichla F. *et al.* 2001).

#### **4.1. GRADO DI CONVERSIONE**

Il numero dei legami metacrilici che non hanno reagito e ancora presenti nella resina polimerizzata indica appunto l'estensione della polimerizzazione (*grado di conversione*, GC ovvero Degree of Conversion, DC) che di norma non è trascurabile (Erikson *et al.* 1984, Young *et al.* 1991, Yoshida K. *et al.* 1993 e Örtengren U. *et al.* 2004).

La caduta di potenza del fascio luminoso può comportare un insufficiente grado di conversione negli strati più profondi del materiale; questo influenza negativamente sulle proprietà meccaniche, estetiche del restauro, l'assorbimento di fluidi e la biocompatibilità (Giampiero T. *et al.* 2008).

Il grado di conversione è oltremodo variabile ed in ogni caso, in condizioni di impiego standard, ben difficilmente supera il 75% (Vankerckhoven *et al.* 1981, Amaral *et al.* 2002, Tarle *et al.* 1998). Questo non vuol dire che il 25% dei monomeri non polimerizza, ma che il 25% dei doppi legami dei gruppi metacrilici resta insaturo e, poiché ogni monomero presenta più gruppi metacrilici, probabilmente, nei casi migliori di conversione polimerica, ogni molecola partecipa alla reazione con almeno uno di essi.

Durante la polimerizzazione, l'intensità della luce è massima alla superficie e diminuisce generalmente negli strati inferiori ( Figura 12).

La profondità massima di penetrazione della luce varia da 2 a 3 mm nel restauro ed è la massima profondità di polimerizzazione a grado di conversione mediamente costante (Nomoto *et al.* 1994; Peutzfeldt 1994). Negli strati sottostanti il numero dei monomeri che non hanno reagito aumenta. Una conversione ottimale dei monomeri della resina composita dipende dalla composizione del monomero stesso. Ruyter 1987, Sandner *et al.* 1997 hanno trovato che il monomero Bis-GMA presenta una conversione molto bassa per la sua elevata viscosità. Al contrario, il monomero TEGDMA presenta un alto grado di conversione (Chung *et al.* 1990, Asmussen *et al.* 1992).

Yoshida *et al.* 1993 afferma che il grado di conversione dipende anche dalla quantità di fotoiniziatore il canforochinone (CQ) nella pasta composita.

## 4.2. CONTRAZIONE DA POLIMERIZZAZIONE

La contrazione da polimerizzazione è uno dei parametri fondamentali che caratterizzano i materiali dentari da restauri a base di resina. Dal suo valore dipende la tensione all'interfaccia fra due materiali diversi o fra tessuto duro biologico e materiale da restauro. La contrazione da polimerizzazione dei compositi è responsabile della fessura marginale dente-otturazione (Figura 13) che viene inevitabilmente invasa dai fluidi orali: i batteri possono così raggiungere i tubuli dentinali, provocando carie secondarie e possibili infiammazioni della polpa (Brannstrom 1982, Goracci *et al.* 1993, Vanni *et al.* 1995, Labella *et al.* 1999, Mangani *et al.* 2000). La polimerizzazione implica una riduzione del volume del composito senza perdita apprezzabile di massa (Versluis *et al.* 1998). È un normale fenomeno chimico che però è uno svantaggio non trascurabile e attualmente non eliminabile, legato all'utilizzo di tale materiale. In media la contrazione è di circa 2.5-7.1% della massa del composito (Felizer *et al.* 1988). Dagli studi di Goracci *et al.* 1992, sull'integrità marginale di restauri polimerizzati con energia gradualmente crescente, si è evidenziato che anche le

tecniche di polimerizzazione hanno un ruolo nel ridurre la contrazione, poiché si è visto che far iniziare la polimerizzazione con una bassa energia migliora il sigillo marginale. Per cercare di ridurre il più possibile le conseguenze della contrazione da polimerizzazione, diventa importante fornire una quantità di energia non troppo elevata durante i primi secondi di polimerizzazione, al fine di ridurre le tensioni interne al composito (Yap *et al.* 2002). Al contrario Hoffmann *et al.* 2003, affermano, nei limiti del loro lavoro, che una metodica di polimerizzazione a bassa energia iniziale non migliora il sigillo marginale e che quella ad alta energia non ne provoca un netto peggioramento; inoltre, sostengono che un materiale con basso coefficiente di contrazione sembra essere più importante per preservare l'adesione piuttosto che le tecniche di polimerizzazione.

Uctasli *et al.* 2002, hanno evidenziato un peggioramento del sigillo marginale effettuando la polimerizzazione con lampada ad alta energia rispetto alla polimerizzazione con lampada alogena tradizionale.

## **5. SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo della presente tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze della Prevenzione, svolta nel Dipartimento di Sanità Pubblica presso l'Università Degli Studi di Parma, è stato quello di valutare *in vitro* l'effetto della degradazione di sei materiali compositi (tre resine composite, due compomeri ed un bond) a base di resina attivate tramite luce visibile in ambiente acquoso sulle cellule fibroblasti L-929. L'originalità di questa ricerca, sta nel fatto che i sei compositi presi in esame, sono stati posti nelle medesime condizioni; ossia il test di citotossicità è stato eseguito su questi materiali in modo contemporaneo, nel medesimo periodo, nelle stesse condizioni di temperatura e umidità, dallo stesso operatore. Inoltre i materiali testati sono stati preparati e utilizzati secondo un protocollo clinical use e cioè preparati direttamente e secondo le indicazioni delle case produttrici, quando non diversamente specificato, e da un unico laboratorio.

Le ipotesi di partenza sono state:

1. Verificare se la citotossicità prodotta dalla massa volumetrica dei materiali ha un'origine diversa dalla citotossicità prodotta dalla superficie dei campioni. Infatti, mentre in quest'ultimo caso si può invocare come causa

principale il rilascio di monomeri diffusi nello strato superficiale, nel caso della citotossicità indotta dal materiale massivo questo stesso meccanismo, se fosse attuato, porterebbe alla rapida dissoluzione dei materiali. Questa dissoluzione non si verifica nella pratica clinica.

2. Verificare se la reazione di citotossicità indotta da rilascio si esaurisce in un tempo limitato (circa una settimana).

3. Controllare la diversità di comportamento dei materiali.

4. Esaminare il ruolo del grado di conversione polimerica sulla citotossicità di campioni esposti alla luce alogena per tempi diversi.

Per realizzare questi obiettivi si è fatto quanto segue:

-si è vista la macroreazione di citotossicità di campioni variamente irraggiati nell'intervallo di tempo 1-40 sec,

-si è vista al microscopio ottico la reazione di lisi.

-si è valutata la variazione del grado di conversione polimerica dei campioni diversamente irraggiati mediante misure di contrazione da polimerizzazione utilizzando il metodo della scansione del fascio laser ,

-si è confrontata la microstruttura dei materiali sottoposti a rilascio, utilizzando la microscopia confocale a fluorescenza,

- si è misurata la citotossicità da misure di assorbanza. I risultati sono stati valutati statisticamente (ANOVA, test Student t).

## **6. MATERIALI E METODI**

## 6.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I materiali studiati sono stati selezionati tra quelli più utilizzati nelle cliniche odontoiatriche in Italia e nei più sviluppati e disponibili in commercio. In effetti sono prodotti di case produttrici tra le più affidabile (3M, Dentsply, Enamel, Kerr e Kulzer). I sei diversi materiali sono riportati nella tabella 2. I campioni ottenuti sono modellati a forma di disco pressando sfere di materiale non polimerizzato tra due vetrini. Si sono così ottenuti campioni a forma di dischi (~6 mm di diametro, ~1 mm di spessore e ~15 mg di peso) (Figura 14).

Questi campioni sono stati irraggiati attraverso i vetrini di 1 mm di spessore con luce alogena a tempi diversi a seconda delle diverse analisi effettuate, utilizzando una unità di polimerizzazione a lampada alogena della ditta 3M, che erogava  $450 \text{ mW/cm}^2$  (Figura 15). I campioni sono stati successivamente delicatamente staccati dai vetrini ed immersi in acido lattico 10% per 24 ore in modo da rimuovere qualunque contaminazione della superficie. Poi tutti i campioni sono stati delicatamente lavati con acqua bidistillata ed immersi in acqua a  $37^\circ\text{C}$  per indurre l'assorbimento di acqua e conseguente rilascio come

mostrato in Figura 16. Dopo una settimana di immersione, i campioni sono stati sottoposti alle diverse analisi e saggi di citotossicità.

## **6.2. COLTURE CELLULARI**

L'utilizzo di coltivazioni cellulari per la valutazione della biocompatibilità *in vitro* dei materiali dentari si va sempre più estendendo nelle varie discipline dell'odontoiatria moderna (Schmalz 1997, Ciapetti *et al.* 1998 e van Wyk *et al.* 2001). In questo studio sono stati usati Substrati cellulari di L929 ( Mouse connective tissue) BS CL 56 Sandoz fornita dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. Di morfologia (fibroblastic-like). Molti lavori hanno confermato che questi monostrati di fibroblasti sono modelli di scelta per valutare gli effetti citotossici dei materiali dentari da restauro perché gran parte delle cellule nella polpa dentale sono di tipo fibroblasti (Leirskar *et al.* 1972, Wnnbwrq *et al.* 1979, Hume 1984, Feigal *et al.* 1985, Yesilsoy *et al.* 1985). I fibroblasti L929 (linea cellulare di topo) sono stati fatti crescere in incubatore con atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C in

terremo di coltura DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) e arricchito con 10% di siero fetale bovino (FBS).

### **6.3. REAZIONE DI CITOTOSSICITÀ**

L'effetto tossico delle sostanze rilasciate dalla resina composita è stato esaminato mettendo i dischetti di composito, ottenuti come precedentemente descritto, in contatto diretto con la linea cellulare L929 in pozzetti, che venivano poi messi in incubatrice e controllati ogni 12 ore per una settimana. La vitalità cellulare è stata determinata tramite il saggio MTT, e l'osservazione macroscopica e microscopica dei pozzetti. Quando i campioni esibivano l'effetto di citotossicità, venivano lavati di nuovo con acqua bidistillata ed immersi di nuovo in acqua per un'altra settimana. Si ripeteva in seguito il test di vitalità per determinare la durata totale del tempo di rilascio.

#### **6.4. SAGGIO DI VITALITA' (MTT assay)**

Il saggio MTT è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. Ciò accade prevalentemente nei mitocondri; può essere utilizzato per determinare la sopravvivenza cellulare (Mosmann 1983). L'enzima mitocondriale di succinato deidrogenasi è attivo infatti soltanto nelle cellule vive. La sua funzione consiste nell'aprire l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione, in conseguenza, di formazano (un sale blu). Tale reazione è stata valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione (spettrofotometro della ditta Hewlett Packard) alla lunghezza d'onda di 620 nm. I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando l'analisi statistica della varianza (ANOVA), il Student t. il valore di  $P \leq 0.001$  venne considerato statisticamente significativo.

## **6.5. MICROSCOPIA CONFOCALE A FLUORESCENZA (MCF)**

Il microscopio confocale è un microscopio ottico, uno strumento scientifico che si basa su una tecnologia volta ad accrescere sensibilmente la risoluzione spaziale del campione, eliminando gli aloni dovuti alla luce diffusa dai piani fuori fuoco del preparato (Figura 17). Lo strumento opera nel campo convenzionale degli ingrandimenti della normale microscopia ottica, ed è schematicamente costituito da un normale microscopio a trasmissione a cui viene sovrapposto un apparato tipo laser che si occupa di illuminare e rilevare con una scansione punto a punto l'immagine di un campione imbevuto di fluido fluorescente sensibile alla frequenza del laser (480 nm). Le immagini ottenute, sincronizzando col fascio di eccitazione il dispositivo di rivelazione, sono particolarmente definite, e permettono di evidenziare in diversi colori i diversi dettagli presenti nel preparato, permettendone di apprezzarne la tridimensionalità. Nel presente studio è stato utilizzato il colorante fluorescente EOSIN in soluzione d'acqua allo 0.25%. si sono così individuate le modifiche strutturali indotte dall'invecchiamento dei campioni in ambiente acquoso, si è determinata la fonte principale della

citotossicità indotta dalla matrice del materiale e la continuità di tale effetto col tempo. Dopo aver analizzati i campioni appena irraggiati, per saggiare le proprietà della parte interna, gli stessi campioni erano sottoposti alla rimozione meccanica della superficie ( $\sim 20 \mu\text{m}$ ) poi lavati con acqua bidistillata e immersi di nuovo in soluzione di eosina al 0.25% per 24 ore. Quindi venivano osservate le modifiche strutturali avvenute dopo una settimana di invecchiamento in acqua.

## **6.6. MISURAZIONE DELLA CONTRAZIONE**

La misurazione della variazione dimensionale lineare del campione è stata ottenuta con una apparecchiatura originale basata sulla scansione di un fascio di luce LASER a elio-neon (laser He-Ne di II classe, Figura 18), con lunghezza d'onda pari a 632.8 nm. Questa lunghezza d'onda è sufficientemente lontana dai valori sensibili per i fotoiniziatori. Nella letteratura vengono riportati molti studi sulla contrazione di materiali resinosi. Il limite di questi studi sperimentali sta nell'uso di strumenti di misura che non riproducono le condizioni cliniche

dell'irraggiamento effettuate in uno studio dentistico (Bandyopadhyay 1982, Goldman 1983, Fano *et la.* 1997). In questo lavoro si è utilizzata una tecnica di misura della contrazione basata sulla scansione del campione con un raggio laser. Il tempo di scansione del materiale esaminato è proporzionale alla lunghezza del campione. Si effettuano così misure di lunghezza con una risoluzione di  $\pm 1.0\mu\text{m}$ , e precisione pari a  $\pm 0.5\mu\text{m}$  (Fano *et al.* 1998). La misura è interamente automatizzata e computerizzata tramite uso di un software creato in laboratorio.

## **7. RISULTATI e DISCUSSIONI**

### **7.1. REAZIONE MACROSCOPICA DIRETTA**

Dopo che i campioni e i terreni di coltura sono stati rimossi dai pozzetti, è stato aggiunto il colorante (cristal violet) per valutare la dimensione dell'effetto citotossico in funzione del tempo di esposizione alla luce di polimerizzazione 1, 5, 10, 20 e 40 secondi (Figura 19).

La diminuzione dell'intensità del colore fino al trasparente corrisponde a zone a diverso grado di sofferenza cellulare.

Questo vuole dire che la risposta cellulare ai componenti rilasciati è evidente ed è grossolanamente inversamente proporzionale al tempo di irraggiamento con luce visibile.

In effetti aumentando il tempo di fotopolimerizzazione aumenta anche il grado di conversione dei monomeri.

Questa reazione si esauriva mediamente in una settimana.

### **7.2. REAZIONE DI LISI**

È stato osservato, utilizzando un microscopio ottico (Pentacom) (110-120x), in modo ancora più evidente lo stato di sofferenza cellulare dopo 24 ore di contatto con i campioni del materiale. Al microscopio si può notare la rarefazione del monostrato cellulare e la comparsa di aree

di lisi e di modificazione morfologica delle cellule, che è un sintomo di sofferenza cellulare (Figure 20, 21 e 22). Anche la reazione di lisi si esauriva mediamente in una settimana. I campioni assottigliati meccanicamente manifestavano in modo casuale dopo un'altra settimana di invecchiamento una rinnovata reazione di lisi.

Sia la macroreazione di citotossicità sia la reazione di lisi osservata in tutti i materiali immersi in acqua dopo irraggiamento sono state osservate da altri autori (Ferracane *et al.* 1990, Geurtsen *et al.*, 1998, Schmalz 1998 ). Questo comportamento è spiegabile con la presenza dell'ossigeno atmosferico durante la polimerizzazione. Infatti l'irraggiamento sia in vitro, come nel nostro caso, che nella pratica clinica viene effettuato in aria. E' nota l'azione inibitoria dell'ossigeno riguardante la reazione di polimerizzazione. Questo elemento gassoso impedisce alla maggior parte dei radicali di partecipare alla reazione di propagazione e formare quindi macromolecole. Lo strato superficiale spesso alcuni micrometri in pratica è depolimerizzato. Se questa inibizione è il caso reale, la rimozione dello strato superficiale non dovrebbe fare riapparire la reazione citotossica in tutti i materiali in

nessuno dei materiali. Invece i campioni a cui è stato asportato meccanicamente uno strato superficiale di alcuni micron presentavano a caso reazioni di citotossicità.

### **7.3.MICROSTRUTTURA E RILASCIO**

Per determinare la causa principale della scomparsa e la ricomparsa dell'effetto citotossico dei campioni dopo il primo rilascio, si è cercato di individuare le modifiche microstrutturali indotte dall'invecchiamento (ageing), analizzando al microscopio confocale a fluorescenza il composito Venus ed il compomero Exi 119 e un compomero Dyract. La superficie (circa 20 $\mu$ m di spessore delle due facce dei dischetti) di campioni, che dopo due settimane di invecchiamento avevano esaurito l'azione citotossica, veniva rimossa con lama sterile di acciaio. I campioni assottigliati venivano invecchiati in acqua per una settimana ed analizzati al MCF.

Tutti i materiali presentano una certa porosità (circa 1,5 % del volume totale). I campioni però si differenziavano nel contenuto delle bolle.

Campioni di Venus che si sono manifestati citotossici, mostravano anche la presenza di porosità contenute acqua (Figura 24). Invece nel compomero Dyract, che non ha dimostrato una reazione citotossica, è stata notata una porosità vuota d'acqua, perciò piena di aria ( $O_2$ ), (Figura 23). Questi risultati suppongono la presenza di microfissure -microcracks- come visto nel compomero Exi 119, che connettono le bolle con il liquido dell'ambiente esterno (Figura 25). La presenza dell'acqua nella porosità dei materiali citotossici anche dopo la rimozione dello strato superficiale giustifica il rilascio di frazioni di monomeri non polimerizzati dalla superficie delle bolle.

#### **7.4. MISURA DI VITALITA'**

Oltre ai sudetti saggi, è stato utilizzato anche il saggio colorimetrico di vitalità cellulare (MTT) e eseguito secondo la procedura descritta in materiali e metodi. Le reazioni diverse sono state valutate e misurate con un sistema di lettura d'assorbanza spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 620 nm. I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando l'analisi statistica della varianza (ANOVA), il

Student t. il valore di  $P \leq 0.001$  venne considerato statisticamente significativo.

Le misure colorimetriche venivano effettuate su due gruppi di campioni. Un primo gruppo era costituito solo da campioni con porosità contenente acqua (composito Venus, vedi Figura 26); un secondo gruppo era costituito da campioni avente porosità vuota d'acqua (compomero Dyract, vedi Figura 27). Ognuno di questi due gruppi era costituito da due sottogruppi di cinque campioni ciascuno, irraggiati rispettivamente per 10 sec e per 40 sec. Pertanto le Figure 26 e 27 mettono a confronto il ruolo della porosità contenente acqua rispetto alla porosità vuota d'acqua e, inoltre, per ogni materiale si confronta l'influenza del tempo di irraggiamento sull'assorbanza.

I vari test riportati nelle due figure riepilogano tutti i trattamenti subiti dai campioni e già visti anche con gli altri tipi di test (macroreazione e reazione di lisi). In effetti i vari test delle Figure 26 e 27 si riferiscono agli stessi campioni che subiscono una serie successiva di operazioni, che vanno dall'immersione in acqua un giorno dopo l'irraggiamento e successivo invecchiamento in acqua

per una settimana (test 1) ad un ulteriore invecchiamento per un'altra settimana per il controllo della durata del rilascio (test 2). Il test 3 riporta i dati dell'assorbimento del materiale massivo dopo rimozione dello strato esterno e successivo invecchiamento di una settimana in acqua, mentre con il test 4 si determina la durata di quello che era stato visto con il test 3.

Più in dettaglio, nella figura 26 (Venus) si nota che:

I campioni di Venus solo irraggiati e immersi in acqua per una settimana sono citotossici indipendentemente dalla durata dell'irraggiamento (test 1).

L'effetto citotossico scompare se gli stessi campioni vengono invecchiati per un'altra settimana (test 2). Questo andamento conferma il comportamento notato con la macroreazione di citotossicità e con la reazione di lisi.

Il test 3 è cruciale per risolvere il dilemma se la citotossicità osservata con il test 1 è indotta dal basso grado di polimerizzazione superficiale soltanto (senza il contributo della matrice interna) oppure la citotossicità del test 1 è indotta anche dal contributo della diffusione di

monomeri a basso peso molecolare, provenienti dall'interno del volume. In quest'ultimo caso i campioni dovrebbero continuare a non manifestare più reazione citotossica anche dopo rimozione dello strato esterno. Il test 3 di Figura 6 attesta che dopo la rimozione della superficie esterna, il materiale ritorna ad essere citotossico. Pertanto questa nuova fonte tossica non può che derivare dal rilascio di frazione di monomeri scarsamente polimerizzati provenienti dall'interno della porosità.

Questa spiegazione trova giustificazione nel fatto che la porosità dei campioni di Figura 26 contiene acqua necessaria all'operazione di rilascio. L'acqua penetrata nell'interno delle bolle attraverso microfratture presenti in questi materiali (vedi Figura 28) è anche mezzo di diffusione dalla porosità verso l'esterno. I vuoti nelle matrici resinose non sono conseguenza della degradazione del materiale formati a causa del rilascio, come proposto da Ferracane (1994), ma sono precedenti al rilascio, come mostrano i risultati dell'indagine di microscopia confocale a fluorescenza, e sono la causa del rilascio. La presenza di monomeri a basso grado di polimerizzazione nell'interno della porosità è dovuta all'incorporazione di aria durante la

omogeneizzazione dei componenti operata dal fabbricante. Questa reazione di rilascio dalla porosità interessa solo lo strato successivo affiorato dopo la rimozione della superficie del materiale irraggiato e si esaurisce anch'esso in una settimana di invecchiamento (vedi test 4).

A questo processo partecipano solo quelle bolle comunicanti mediante microfessure con l'ambiente acquoso. La Figura 27 si riferisce a campioni di compomero con porosità vuota d'acqua. Il comportamento nelle prime due settimane di invecchiamento indica la solita reazione di citotossicità, comune a tutti i materiali, indotta dallo strato superficiale inibito alla polimerizzazione (test 1 e 2 di Figura 27). A differenza dei campioni Venus a porosità imbevuta d'acqua, in questo caso la rimozione dello strato inibito non comportava la ricomparsa della reazione citotossica (test 3 e 4 di Figura 27). Le bolle vuote di liquido sono indicative di assenza di comunicazione con l'ambiente esterno e conseguente impossibilità di rilascio dall'interno della porosità.

## 7.5. VARIAZIONE DIMENSIONALE

La contrazione da polimerizzazione è uno dei parametri fondamentali che caratterizzano i VLC materiali a base di resina, ed è considerata come uno svantaggio non trascurabile. Una determinata quantità di composito irradiata con la luce della lampada polimerizza e di conseguenza si contrae. Se non si trova adesa ad alcuna struttura o parete dentaria, essa va incontro a una riduzione tridimensionale di volume. Se indicassimo i vettori risultanti della contrazione, essi sarebbero rivolti verso il centro della massa di composito. Se tale massa polimerizza adesa alle pareti di una cavità, si trova a interagire con le superfici di adesione. Durante la contrazione essa riduce il suo volume e tende ad occupare meno spazio.

Questo fenomeno provoca un rilascio dei monomeri non reagiti nella polimerizzazione (citotossicità). Secondo il principio di azione e reazione, le pareti esercitano a loro volta una forza di trazione uguale e contraria a quella della massa di composito (fessure marginale).

La frazione di monomeri non polimerizzata potrebbe calcolarsi da misure di contrazione da polimerizzazione. Questo calcolo sarebbe preciso solo nel caso in cui si

sapesse la contrazione prodotta dal conversione totale dei monomeri. Si può invece apprezzare la differenza di monomeri tra campioni di uno stesso materiale irraggiati per tempi diversi. Questi calcoli, riguardanti irraggiamenti di 10 e 40 sec, mostrano che questa differenza è significativa e pressoché costante per tutti i materiali esaminati. I campioni irraggiati per 10 sec hanno circa il 30% in più di monomeri non polimerizzati rispetto ai campioni irraggiati per 40 sec.

Contrariamente ai metodi di solito utilizzati in letteratura, la determinazione di variazione dimensionale eseguita in questo studio viene calcolata dalla misura del tempo di scansione del materiale da parte di un fascio di luce laser che permette di ottenere risultati di massima prescrizione ( $\pm 5\mu\text{m}$ ), esenti da fenomeni spuri, come l'interazione chimica e/o meccanica con l'ambiente circostante. Inoltre i dati raccolti sono stati elaborati con modelli matematici computerizzati. I sei materiali analizzati sono stati divisi a due gruppi, il primo irraggiato per 10 secondi., e il secondo gruppo irraggiato per 40 secondi. È utilizzata una lampada di polimerizzazione alogena della ditta 3M. La procedura è stata eseguita 24 ore dopo irraggiamento.

È stato calcolato la differenza della media su cinque campioni di ogni materiale irraggiati per 10s e quelli irraggiati per 40s  $\pm$ SD. Nella tabella 3, sono riportati i materiali e i risultati ottenuti.

Vista l'influenza della temperatura sul processo di polimerizzazione e quindi sulla contrazione da polimerizzazione (Figura 28). La luce fotopolimerizzante induce riscaldamento dei tessuti duri e molli sui quali agisce; i tessuti gengivali possono avvertire una fastidiosa sensazione di calore già dopo pochi secondi di erogazione della radiazione luminosa; ben più grave è l'effetto che un rialzo termico può avere sulla polpa. Temperature superiori a **42,5°C** devono essere evitate per non indurre necrosi della polpa dentale (Zach *et al.* 1965). La quantità di calore emessa da un apparecchio fotopolimerizzante dipende da numerose fattori variabili: intensità luminosa, tempo di esposizione, natura della sorgente di luce, ma soprattutto dall'efficienze del filtro nel selezionare le lunghezze d'onda utili escludendo quelle caloriche (Fano *et al.* 1998).

## **8. CONCLUSIONI**

La biocompatibilità di materiali dentari a base di resina è un requisito di importanza fondamentale, soprattutto quando questi sono utilizzati per strutture vitali: alcune delle sostanze in essi contenute possono, infatti, interagire con tessuti metabolicamente attivi (Wataha *et al.* 1999).

Dai risultati ottenuti nel presente tesi di Dottorato di Ricerca nelle Scienze della Prevenzione è stato possibile osservare numerosi fattori possono influenzare la polimerizzazione di un materiale a base di resina a parità di sorgente luminosa: la composizione chimica del monomero, la percentuale e le caratteristiche del riempitivo, il colore e la traslucenza della resina sono solo alcuni degli aspetti rilevanti che intervengono nel determinare il grado di polimerizzazione finale. L'ottenimento di materiali ottimizzati nelle loro funzioni dipende dalla esatta conoscenza delle cause che originano le loro proprietà.

In letteratura la citotossicità riscontrata nei materiali oggetto di questo studio è stata attribuita genericamente al fatto che è impossibile ottenere la totale conversione dei monomeri in polimeri. La frazione non polimerizzata, che è massima sulla superficie dei campioni, in parte viene

rilasciata nell'ambiente acquoso circostante generando citotossicità e porosità nell'interno della matrice resinosa.

Se questo fosse vero la citotossicità indotta dal rilascio originato dall'interno dei campioni dovrebbe essere funzione del grado di polimerizzazione e, conseguentemente, del tempo di irraggiamento.

La miscelazione delle paste comportava, tuttavia, l'inclusione di bolle d'aria, che potevano essere causa di porosità e irregolarità di superficie con alterazione delle proprietà meccaniche e soprattutto cromatiche dei restauri nel tempo. Inoltre, l'impossibilità di controllare l'indurimento una volta attivato, fattore critico in fase di modellazione, e parallelamente la necessità di dover attendere il completo indurimento del materiale prima di cominciare la fase di rifinitura, hanno rappresentato da sempre, per questi compositi, limiti fisici non trascurabili al loro impiego clinico.

In questo lavoro si sono individuate due distinte origini di tossicità prodotte dai monomeri non polimerizzati. Una prima causa è, in accordo a quanto riportato da alcuni autori (Schmalz, 1998; Geurtsen, 1998), dovuta al rilascio dalla

superficie del campione. La reazione citotossica è grossolanamente influenzata dai tempi di irraggiamento.

E' stata osservata una struttura porosa di questi materiali, che permette di individuare una seconda causa di citotossicità. La struttura porosa non è effetto del rilascio, ma causa del rilascio. Essa è presente già nei materiali non polimerizzati.

La natura porosa dei materiali non sempre induce citotossicità. Soltanto la porosità interconnessa mediante microfratture con l'ambiente esterno acquoso produce un comportamento citotossico.

Il contributo della parte interna dei campioni alla citotossicità non dipende dalla frazione dei monomeri non polimerizzata. Infatti le misure di contrazione da polimerizzazione indicano una notevole differenza di monomeri tra materiale irraggiato a 10 e 40 sec (Tabella 3), mentre non c'è nessuna differenza nella loro citotossicità (Figura 27).

## **9. BIBLIOGRAFIA**