



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Separação, identificação e citotoxicidade de biomaterial para proteções pulpares diretas

Maria Beatriz Batista Rodrigues Ferreira

Orientador: Doutora Anabela Baptista Pereira Paula

Co-orientador: Doutora Mafalda Sofia Laranjo Cândido

Doutor Nelson António Melo Pereira

Coimbra 2019

O trabalho experimental descrito nesta dissertação foi realizado:

- no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- no Instituto de Clínica Integrada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- no iCBR, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research; CIBB, Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology; CNC.IBILI; Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- no Departamento de Química, da Universidade de Coimbra.

A seguinte dissertação foi redigida segundo as normas disponibilizadas na plataforma Inforestudante a 16/10/2018, com o título “NORMAS PARA A ELABORAÇÃO DO TRABALHO FINAL COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DOS CICLOS DE ESTUDOS INTEGRADOS EM MEDICINA E MEDICINA DENTÁRIA”.

Sumário

| | |
|--|----|
| Resumo | 9 |
| Abstract | 9 |
| 1. Introdução | 10 |
| 2. Material e Métodos | 12 |
| 3. Resultados | 17 |
| 4. Discussão | 24 |
| 5. Conclusão | 27 |
| 6. Agradecimentos | 27 |
| 7. Referências Bibliográficas | 28 |
| 8. Abreviaturas, símbolos e fórmulas | 30 |
| Anexo I | 32 |
| Anexo II | 34 |
| Anexo III | 36 |
| Anexo IV | 38 |
| Anexo V | 45 |

Separação, identificação e citotoxicidade de biomaterial para proteções pulpares diretas

Maria Beatriz Ferreira¹, Mafalda Laranjo^{2,3}, Nelson Pereira⁴, Miguel Marto^{2,3,5}, Teresa Pinho e Melo⁴, Manuel Marques Ferreira^{2,3,6}, Maria Filomena Botelho^{2,3}, Eunice Carrilho^{1,2,3},
Anabela Paula^{1,2,3}

1. Instituto de Clínica Integrada, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
2. Instituto de Biofísica, iCBR, CIMAGO, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
3. CNC.IBILI, Universidade de Coimbra;
4. Centro de Química de Coimbra, Departamento de Química, Universidade de Coimbra;
5. Instituto de Patologia Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
6. Instituto de Endodontia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra.

Área da Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Av. Bissaya Barreto, Bloco de Celas
3000-075 Coimbra
Portugal

Tel.: +351 239 484 183

Fax.: +351 239 402 910

E-mail: mbeatrizferreira96@gmail.com

Resumo

Introdução: A proteção pulpar direta consiste num procedimento minimamente invasivo, no qual é colocado um biomaterial na polpa exposta, para manter a vitalidade do órgão dentário. Em estudos anteriores verificou-se que o biomaterial Life[®] determinou citotoxicidade elevada e morte celular *in vitro*.

Objetivos: Este trabalho teve como principal objetivo a identificação dos compostos presentes neste biomaterial responsáveis pela diminuição da proliferação e da viabilidade de células odontoblásticas (MDPC-23).

Materiais e Métodos: As culturas celulares foram tratadas com os extratos das fases orgânica e aquosa obtidos da extração líquido-líquido de meios condicionados pelo Life[®], com o solvente acetato de etilo. A atividade metabólica foi avaliada (ensaio MTT) e os compostos identificados através de análise química, por técnicas espectroscópicas.

Resultados: O extrato resultante da fase orgânica originou uma diminuição significativa da atividade metabólica, enquanto que com a fração aquosa não foram observados efeitos citotóxicos.

Discussão: A análise química ao extrato orgânico permitiu determinar, pela primeira vez, quais os compostos responsáveis pela morte celular associada ao Life[®]. A citotoxicidade deste material deriva duma mistura dos regioisómeros *orto*, *para* e *meta* da N-etil-toluenosulfonamida. Dado o sucesso clínico moderado deste biomaterial, estes resultados permitem que novos materiais, tendo como base a sua composição, possam ser desenvolvidos com características de biocompatibilidade melhoradas.

Conclusões: Confirmou-se a toxicidade do biomaterial Life[®] nas células MDPC-23 e a N-Etil-o/p/m-toluenosulfonamida foi identificada como o agente tóxico. Tendo em conta os resultados obtidos, a aplicação deste produto não é recomendada.

Palavras-chave: Proteção pulpar direta; Biomaterial; Hidróxido de Cálcio; Citotoxicidade; Odontoblastos.

Abstract

Introduction: Direct pulp capping consists of a minimally invasive procedure in which a material is placed in the exposed pulp, in order to maintain the dental organ vitality. In previous

studies, it was found that the Life[®] biomaterial presented high cytotoxicity and cell death in vitro.

Objectives: Identification of the Life[®] constituents responsible for the decrease in the proliferation and viability of odontoblast-like cells (MDPC-23).

Materials and Methods: The aqueous media conditioned with Life[®] was submitted to liquid-liquid extraction with ethyl acetate. Cells were treated with both organic and aqueous fractions and further MTT assays were carried out to evaluate metabolic activity. The toxic compounds were determined by spectroscopy techniques.

Results: The organic phase showed a significant decrease in metabolic activity. On the other hand, no cytotoxic effect was observed with the aqueous fraction.

Discussion: For the first time, the compounds associated with Life[®] induced cell death were determined. The mixture of isomers (ortho/para/meta) of N-ethyl-toluenesulfonamide is responsible for the cytotoxicity of this biomaterial. Given the moderate clinical success of this biomaterial, our results allow new materials with improved biocompatibility characteristics, to be developed based on Life[®] composition.

Conclusions: The toxicity of biomaterial Life[®] in MDPC-23 cells was confirmed and N-ethyl-toluenesulfonamide was identified as the toxic agent. Based on our results, the application of this product will not be recommended.

Keywords: Direct pulp capping; Biomaterial; Calcium hydroxide; Cytotoxicity; Odontoblasts.

1. Introdução

O órgão dentário, estrutura com elevado grau de complexidade, é formado por tecidos mineralizados, nomeadamente o esmalte, a dentina e o cimento, que envolvem a polpa dentária, um tecido conjuntivo altamente especializado. Localizada no interior da câmara pulpar e do sistema de canais radiculares, a polpa é constituída por um conjunto de células, que incluem odontoblastos, fibroblastos, células de defesa, como macrófagos e células apresentadoras de antígeno e, ainda, células indiferenciadas. Estas células encontram-se dispostas numa matriz extracelular.¹ Para além disso, a polpa dentária apresenta um potencial intrínseco de reparação, que leva à formação de dentina reparadora.²

As cáries dentárias, as lesões iatrogénicas e os traumatismos severos são algumas das condições que podem levar à exposição do tecido pulpar. Ao longo do tempo, têm sido desenvolvidas diferentes estratégias para o tratamento da polpa exposta, que incluem a proteção pulpar, direta e indireta, e a pulpotomia.³ Nestes tratamentos, o objetivo final consiste na preservação do tecido pulpar, com remoção do tecido contaminado, e estimulação da reparação da zona exposta através da produção de uma barreira de tecido mineralizado.⁴

A proteção pulpar direta consiste num procedimento minimamente invasivo, no qual é colocado um biomaterial diretamente na polpa exposta, com o objetivo de manter a vitalidade do órgão dentário.⁵ Idealmente, este deve ser biocompatível, antimicrobiano e deve estimular a formação de dentina terciária ou reparadora.

Durante décadas, o hidróxido de cálcio foi considerado o biomaterial *gold-standard* para proteções pulpares. Este biomaterial apresenta algumas vantagens, como excelentes propriedades antimicrobianas e capacidade de induzir o processo de reparação quando aplicado nos tecidos pulpares. No entanto, o facto de produzir uma ponte dentinária com múltiplos defeitos e porosidades, bem como a sua dissolução ao longo do tempo e incapacidade de promover um selamento a longo-prazo contra a microinfiltração, constituem algumas das desvantagens deste biomaterial.⁶

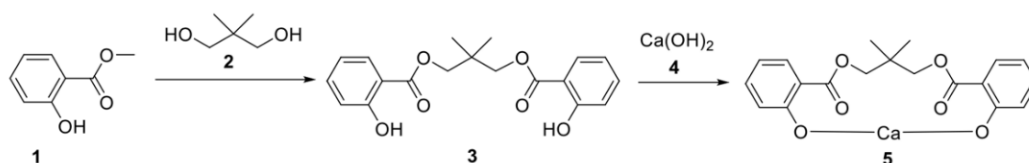
Posteriormente, a melhor compreensão dos processos de reparação e regeneração do complexo pulpo-dentinário, levou ao aparecimento de novos compostos. Os agregados trióxidos minerais surgiram nos anos 90 e, quando comparados com os materiais à base de hidróxido de cálcio, apresentam melhores resultados devido a uma redução dos níveis de necrose e inflamação, bem como, à formação de pontes dentinárias mais densas e com defeitos mínimos em túnel.^{4,5} Contudo, estes biomateriais encontram-se associados a descolorações da estrutura dentária, dificuldade na manipulação e tempo de presa prolongado.⁷ Recentemente, têm sido desenvolvidas e estudadas alternativas aos biomateriais anteriores, nomeadamente os cimentos à base de silicatos tricálcicos.

Em estudos realizados anteriormente por Paula *et al.*,⁸ foram avaliados diferentes materiais utilizados na terapêutica de proteção pulpar direta, representativos dos grupos acima descritos. Concluiu-se que o biomaterial Life[®], um cimento à base de hidróxido de cálcio, provocou uma diminuição da atividade metabólica e viabilidade celular, estando associado ao aumento da morte celular. Este biomaterial é formado por um sistema de duas pastas que, de acordo com o fabricante (Kerr Hawe, Bioggio, Switzerland), apresenta a composição descrita na tabela 1. A mistura das duas pastas desencadeia as reações químicas representadas no esquema 1, levando à formação dum dissalicilato complexado com cálcio, que é a base do cimento.^{9,10}

Tabela 1: Descrição da composição química do biomaterial utilizado.

| Pasta base | Pasta catalisadora |
|--|--|
| Óxido de zinco (ZnO); hidróxido de cálcio (Ca(OH) ₂); óxido de cálcio (CaO). | Salicilato de metilo (C ₈ H ₈ O ₃); sulfato de bário (BaSO ₄); dióxido de titânio (TiO ₂); 2,2-dimetilpropano-1,3-diol (C ₅ H ₁₂ O ₂). |

A elevada utilização do biomaterial Life[®] na prática clínica justifica a pertinência deste projeto de investigação cujo principal objetivo se focou na identificação dos componentes presentes neste biomaterial responsáveis pela sua citotoxicidade.



Esquema 1: Reações químicas envolvidas na preparação do cimento dentário a partir do hidróxido de cálcio, comercialmente designado de Life[®]. A transterificação do salicilato de metilo (1) com o 2,2-dimetilpropano-1,3-diol (2) origina o dissalicilato (3) que complexa com o cálcio para dar origem ao composto 5.

2. Material e Métodos

2.1. Biomaterial

Neste estudo foi utilizado o biomaterial Life[®], que se apresenta na forma de duas pastas, base e catalisadora. Para a preparação do material, as pastas foram manipuladas e misturadas em partes iguais, de acordo com as instruções.

A planificação dos estudos *in vitro* seguiu a norma ISO 10993-5 (“International Standard of Biological Evaluation of Medical Devices – part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity”) ¹¹

que estabelece procedimentos adequados para a avaliação da citotoxicidade de materiais dentários.

Assim, foram misturadas e espatuladas partes iguais das duas pastas e colocadas em moldes de placas de policloreto de polivinila (do inglês, *Polyvinyl Chloride*, PVC) de 3 mm de diâmetro por 1,5 mm de espessura e manteve-se a uma temperatura de 37°C numa atmosfera com 95% de humidade relativa, durante 24 horas. Após o tempo de presa, os fragmentos obtidos foram designados por *pellets*. Após este período, os *pellets* foram retirados do molde colocados em caixas de 6 poços e esterilizados com uma lâmpada de luz ultravioleta (U.V.), durante 20 minutos para cada face.

Concluída a esterilização, procedeu-se à preparação das soluções condicionadas, pelos biomateriais na câmara de fluxo laminar. De acordo com o protocolo utilizado em estudos anteriores,⁸ incubou-se meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma D-5648) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês, *fetal bovine serum*, Sigma F7524), com substrato (*pellets*). O condicionamento do meio de cultura foi realizado em tubos de *falcon*, numa relação de 250 mm² de superfície de contacto do material por mL de solução (ou seja, 9 *pellets* por mL de meio de cultura) durante 24 horas a 37°C, na incubadora HeraCell 150. O meio condicionado obtido foi diluído com igual volume de DMEM fresco de modo a obter soluções para as quais se considerou uma concentração de 50%. As diluições sucessivas foram obtidas do mesmo modo.

Face aos nossos objetivos, que incluíram a identificação dos componentes ativos do meio condicionada por análise química, prepararam-se de igual modo soluções de água condicionada de modo a permitir a obtenção de amostras com menor “ruído”. Dada a complexidade do meio de cultura, a utilização de soluções de água condicionada facilita a extração líquido-líquido. Para isto, utilizou-se água ultrapura autoclavada que foi incubada com a mesma área de contacto do biomaterial durante 24 horas a 37°C. Após este período, considerou-se a água condicionada e foi realizada uma diluição em igual volume de DMEM duplamente concentrado, formando assim a concentração ½, equivalente à de meio condicionado previamente descrita. As concentrações inferiores foram obtidas por diluição em meio DMEM.

2.2. Extração líquido-líquido

Após a preparação da água condicionada com o biomaterial Life[®], como descrito anteriormente, a solução (20 ml) foi submetida a uma extração com acetato de etilo (2 × 20

ml). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporado o solvente a pressão reduzida.

2.3. Separação por Coluna de Cromatografia

Os compostos foram purificados por cromatografia “*flash*” em coluna de sílica, usando gel de sílica 60 (0,035-0,070 mm) adquirida na Acros Organics, usando diclorometano como eluente, e controlando a eluição por cromatografia em camada fina (TLC). Os controles por cromatografia em camada fina (TLC) foram realizadas utilizando placas pré-revestidas de sílica gel Macherey-Nagel Xtra SIL G / UV254.

2.4. Análise química

Os espectros de ressonância magnética nuclear, RMN ¹H e RMN ¹³C, foram obtidos nos espectrômetros Bruker Avance III, operando a 400 MHz (RMN ¹H) e a 100 MHz (RMN ¹³C). O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃). Os valores dos desvios químicos são apresentados em partes por milhão (ppm) relativamente ao padrão interno tetrametilsilano (TMS) e os valores das constantes de acoplamento (J) são expressos em Hz. Os espectros de infravermelho (IV) foram adquiridos num espectrômetro Agilent Technologies Carey 630 FTIR com ATR. A análise por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS) foi efetuada num cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820 Series GC System acoplado a um espectrômetro de massa Agilent Technologies 5975 MSD System.

2.5. Culturas Celulares

Neste trabalho foi utilizada a linha celular do tipo odontoblastos de rato MDPC-23, sendo a utilização desta linha celular recomendada em estudos *in vitro* que pretendam avaliar a biocompatibilidade de materiais dentários.¹² As células foram cultivadas e propagadas de modo a obter um número de células suficiente para a realização das experiências e suas repetições.^{13,14} Foram então mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂, em incubadora HeraCell 150. O meio de cultura utilizado foi o DMEM suplementado com 10% de FBS (Sigma F7524), 250 µM de piruvato de sódio (Gibco 11360) e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomina; Sigma A5955).

Para a realização dos estudos *in vitro* foi necessário distribuir as células por placas. Após observação ao microscópio dos frascos com culturas celulares e seleção do que apresentava maior confluência, removeu-se o meio de cultura do mesmo e lavou-se com 5

mL de tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffered saline* - PBS). O PBS foi obtido através da mistura de cloreto de sódio (NaCl) a 137 mM (Sigma, S7653), cloreto de potássio (KCl) a 2,7 mM (Sigma, P9333), hidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄) a 10 mM (Sigma, S5011) e hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) a 1,8 mM (Sigma, P0662), dissolvidos em água destilada com pH ajustado a 7,4. De seguida adicionou-se 3 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25 % (Sigma T4049) e incubou-se durante cinco minutos a 37°C, de modo a garantir a separação celular. Após esse período, o frasco foi observado ao microscópio para garantir que as células se encontravam destacadas do frasco e, seguidamente, com o objetivo de inativar a ação da tripsina, adicionou-se meio de cultura (pelo menos o dobro do volume correspondente à tripsina).

Para proceder à contagem, a suspensão celular contida no frasco foi transferida para um tubo de *falcon* e com uma micropipeta foram retirados 20 µL dessa suspensão. Estes foram colocados num *ependorf*, o qual já continha 20 µL do corante Azul de Tripiano, suspendeu-se e colocou-se sobre a câmara de Neubauer, num microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS 100) com ampliação de 100x. Após a contagem, ajustou-se o volume das suspensões celulares com meio de cultura, de forma a obter a concentração celular pretendida para cada estudo.

Prepararam-se suspensões com 50.000 células/mL que foram distribuídas por placas de 12 ou 96 poços e foram incubadas *overnight*, de forma a promover a adesão celular aos poços.

2.6. Estudos de citotoxicidade

Após as placas ficarem incubadas *overnight*, administrou-se o Life[®] na concentração de 50% (½), sob a forma de soluções condicionadas, bem como os extratos da fração orgânica e aquosa, obtidas da extração líquido-líquido, nas concentrações de 6,25%;12,5%;25%;50% e 100%.

Em todos os ensaios foram realizados controlos que corresponderam a culturas celulares não submetidas a qualquer tratamento, apenas mantidas em DMEM com 10% de FBS. No ensaio do extrato orgânico foi realizado também um controlo que correspondia a células mantidas em DMEM (com 10% de FBS), ao qual foi adicionada a percentagem de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizada na dissolução desta fase. As culturas celulares foram incubadas durante 24, 72 e 120 horas.

2.7. Atividade metabólica

Para avaliar o efeito dos biomateriais na atividade metabólica das células realizou-se o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O MTT é reduzido por células metabolicamente ativas devido à ação das enzimas desidrogenases. As desidrogenases têm a capacidade de clivar os anéis de tetrazólio do MTT de cor amarela e formar cristais de formazano de cor azul escura que podem ser posteriormente solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos.

Para tal, o meio das placas de 96 poços foi aspirado e procedeu-se à lavagem de cada poço com PBS. Posteriormente, em cada poço da placa de cultura, colocaram-se 50 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL; Sigma M2128) preparada em PBS, com pH de 7,4, e incubaram-se as placas no escuro a 37°C durante a noite.¹⁵ De forma a solubilizar os cristais de formazano obtidos, acrescentaram-se a cada poço 100 µL de uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol e deixaram-se as placas em agitação durante 30 minutos. Posteriormente, homogeneizou-se cada poço com uma micropipeta e foi lida a sua absorvância no espectrofotómetro EnSpire® no comprimento de onda de 570nm, tendo esta como valor de referência a absorvância de 620nm. A atividade metabólica expressou-se como percentagem da atividade metabólica das culturas submetidas aos meios condicionados em relação à atividade metabólica das culturas celulares controlo.^{8,16,17}

2.8. Viabilidade Celular

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular foi realizado o teste de exclusão por Azul de Tripiano. Para isso, foram preparadas placas de 12 poços como anteriormente descrito e procedeu-se à contagem celular como indicado no ponto 2.5.

Este ensaio é utilizado para determinar o número de células viáveis numa suspensão celular e baseia-se no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem certos corantes, enquanto as células mortas não. Assim, procedeu-se à contagem das células viáveis (não coradas) e das não viáveis (coradas) e calculou-se a viabilidade celular através da seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

2.9. Análise estatística

Realizou-se a análise estatística com recurso ao software GraphPad, Prism 8. Para a avaliação da normalidade da distribuição das variáveis quantitativas utilizou-se o teste *Shapiro-Wilk*.

Realizou-se a comparação da atividade metabólica das culturas celulares submetidas a tratamento com as culturas celulares controlo, normalizadas a 100%, utilizando o teste t para uma amostra nos casos em que se verificou uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Quando se verificou o contrário, realizou-se o teste de *Wilcoxon*. Os valores de p foram corrigidos segundo o método de *Bonferroni*.

Compararam-se os resultados da viabilidade celular através da ANOVA (do inglês, *analysis of variance*) de um fator, após confirmação dos critérios de normalidade e homogeneidade de variâncias. Foram realizadas comparações múltiplas entre os grupos e a respetiva correção de *Bonferroni*.

Foi considerado um valor de significância de 5% para todas as comparações.

3. Resultados

3.1. Atividade Metabólica

A atividade metabólica da cultura MDPC-23 encontra-se representada na figura 1.

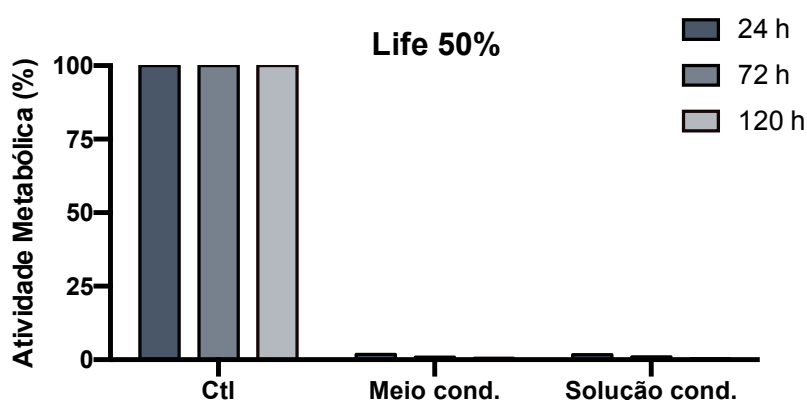


Figura 1: Atividade metabólica das culturas celulares de odontoblastos MDPC-23 expostas durante 24, 72 e 120 horas, ao meio condicionado e à solução condicionada (água ultrapura condicionada reconstituída com DMEM duplamente concentrado) pelo biomaterial Life[®], na concentração de 50%.

Os resultados apresentam-se na forma de média e erro padrão de um mínimo de três experiências em triplicado.

Tal como nos estudos realizados anteriormente,⁸ o tratamento com o meio condicionado com Life[®] determinou a diminuição significativa da atividade metabólica, para os períodos de incubação de 24, 72 e 120 horas.

Para além disso, a exposição das células à solução condicionada, formada pelo meio de cultura DMEM duplamente concentrado e pela água ultrapura, levaram a igual diminuição da atividade metabólica, para os três períodos de incubação.

A atividade metabólica das células MDPC-23 submetidas ao extrato da fração orgânica do biomaterial Life[®], nos períodos de incubação de 24, 72 e 120 horas, encontra-se representada na figura 2.

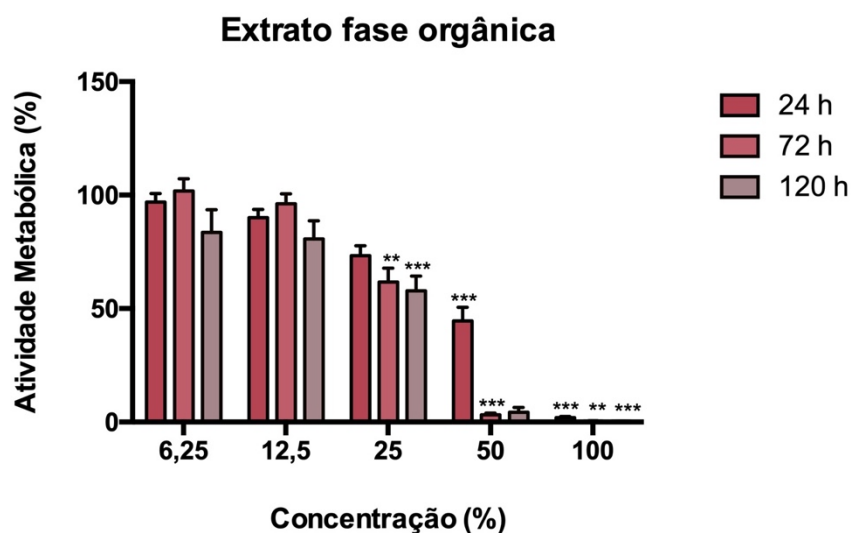


Figura 2: Atividade metabólica das culturas celulares de odontoblastos MDPC-23 expostas durante 24, 72 e 120 horas à fase orgânica do biomaterial Life[®]. Os resultados apresentam-se na forma de média e erro padrão de um mínimo de três experiências em triplicado. Quando existem diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo, estas estão representadas através de um *, sendo que * significa $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Numa primeira análise, podemos observar que a fração orgânica determinou, com o aumento da concentração, uma diminuição da atividade metabólica. Para as culturas celulares submetidas à fase orgânica nas concentrações de 6,25% e 12,5%, a atividade metabólica manteve-se equivalente à das culturas celulares controlo não tratadas, após 24,

72 e 120 horas de incubação. Para a concentração de 25%, verificou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica, após 72 horas de incubação, para $61,40\% \pm 6,124$ ($p=0,07$) e, após 120 horas de incubação, para $57,82 \pm 6,517$ ($p<0,001$). O extrato orgânico na concentração de 50% determinou diminuição significativa da atividade metabólica para $44,99 \pm 6,073$ ($p<0,001$) e para $3,21 \pm 0,783$ ($p<0,001$), para os tempos de incubação de 24 horas e 72 horas, respetivamente. Na concentração de 100%, observou-se uma diminuição acentuada da atividade metabólica para $1,95 \pm 0,451$ ($p<0,001$), para $0,48 \pm 0,100$ ($p=0,075$) e para $0,40 \pm 0,090$ ($p<0,001$), após 24, 72 e 120 horas de incubação, respetivamente.

A atividade metabólica das células MDPC-23 submetidas à fração aquosa do biomaterial Life[®], nos períodos de incubação 24, 72 e 120 horas, encontra-se representada na figura 3.

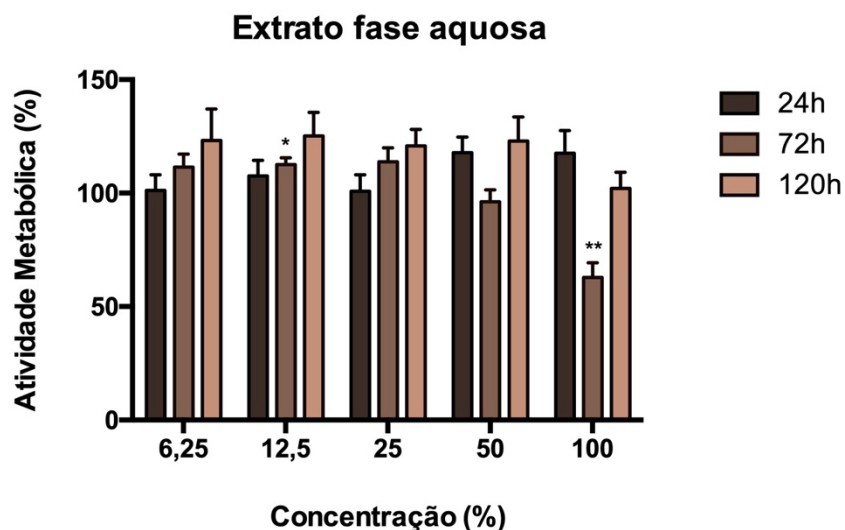


Figura 3: Atividade metabólica das culturas celulares de odontoblastos MDPC-23 expostas durante 24, 72 e 120 horas, à fase aquosa do biomaterial Life[®]. Os resultados apresentam-se na forma de média e erro padrão de um mínimo de três experiências em triplicado. Quando existem diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo, estas estão representadas através de um *, sendo que * significa $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

De um modo geral, o tratamento com o extrato da fase aquosa não determinou alterações significativas da atividade metabólica, em relação às culturas celulares controlo não tratadas, apresentando sempre valores superiores a $62,75 \pm 6,580$. Registou-se um aumento estatisticamente significativo para a concentração de 12,5%, após 72 horas de

incubação, para $112,50 \pm 3,017\%$ ($p=0,024$). Também se verificou uma diminuição com significado estatístico, para a concentração de 100%, após um período de 72 horas, para $62,75 \pm 6,576$ ($p=0,007$).

3.2. Viabilidade celular

A viabilidade celular da cultura MDPC-23 encontra-se representada na figura 4.

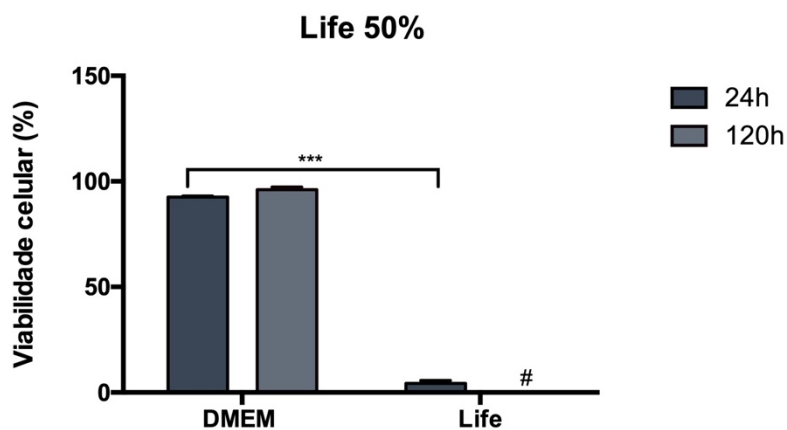


Figura 4: Viabilidade das células MDPC-23 expostas durante 24 e 120 horas, ao tratamento com os meios condicionados pelo biomaterial Life[®], na concentração de 50%. Os resultados apresentam-se na forma de média e erro padrão de um mínimo de três ensaios. Quando existem diferenças estatisticamente significativas entre condições, estas estão representadas através de um *, sendo que * significa $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os grupos para os quais o valor de viabilidade foi de zero, encontram-se representados através de #.

A viabilidade celular foi avaliada por comparação com as culturas celulares do grupo controlo não submetidas a tratamento. Para um período de exposição de 24 horas aos meios condicionados pelo biomaterial Life[®], na concentração de 50%, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular para $4,27 \pm 1,452\%$ ($p < 0,001$). Para um período de exposição de 120 horas não se verificou viabilidade celular.

Os resultados experimentais da viabilidade das células MDPC-23 submetidas ao extrato da fase orgânica do biomaterial Life[®] estão representados na Figura 5.

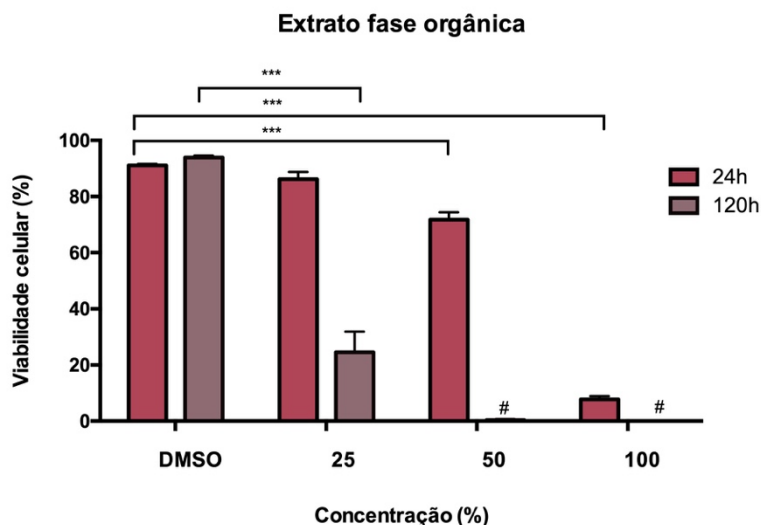


Figura 5: Viabilidade das células MDPC-23 exposta ao extrato da fase orgânica, durante 24 horas e 120 horas. Os resultados apresentam-se na forma de média e erro padrão, com um mínimo de três ensaios. Quando existem diferenças estatisticamente significativas entre condições, estas estão representadas através de um *, sendo que * significa $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os grupos para os quais o valor de viabilidade foi de zero, encontram-se representados através de #.

De um modo geral, o tratamento com o extrato orgânico determinou, com o aumento do tempo de incubação e com o aumento da concentração, uma diminuição significativa da viabilidade celular. Foram realizadas comparações entre os grupos submetidos à fração orgânica e as células do grupo controlo tratadas com DMSO, que corresponde ao solvente utilizado na dissolução da fração orgânica.

Desta forma, observou-se que, para um período de incubação de 24 horas, as células expostas a uma concentração de 50% apresentaram uma perda de viabilidade celular para $67,82 \pm 5,703\%$ ($p < 0,001$) e para a concentração de 100% uma perda acentuada para $7,44 \pm 1,740\%$ ($p < 0,001$).

Após as 120 horas de exposição, para a concentração de 25% verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular, em relação às culturas celulares do grupo controlo para $24,59 \pm 7,322\%$ ($p < 0,001$). Relativamente às concentrações de 50% e 100%, para o mesmo tempo de exposição, não se obteve viabilidade celular.

Os resultados experimentais da viabilidade das células MDPC-23 submetidas ao extrato da fase aquosa do biomaterial Life[®] estão representados na Figura 6.

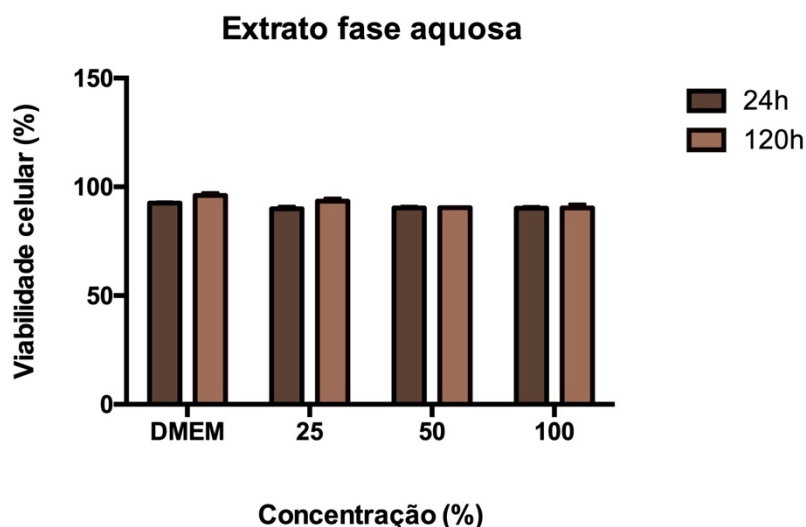


Figura 6: Viabilidade das células MDPC-23 exposta ao extrato da fase aquosa, durante 24 horas e 120 horas. Os resultados apresentam-se na forma de média e erro padrão, com um mínimo de três ensaios. Quando existem diferenças estatisticamente significativas entre condições, estas estão representadas através de um *, sendo que * significa $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os grupos para os quais o valor de viabilidade foi de zero, encontram-se representados através de #.

Para os períodos de incubação de 24 e 120 horas, as células do tipo odontoblastos submetidas à fase aquosa do biomaterial não sofreram alterações significativas da viabilidade celular, observando-se sempre valores superiores a $89,98 \pm 1,134\%$.

3.3. Análise química do extrato orgânico

A água condicionada com o Life[®] foi submetida a extração líquido-líquido e o extrato orgânico purificado por coluna de cromatografia em "flash". Após o isolamento, e depois de removido o eluente por evaporação a pressão reduzida, foi obtido um óleo com uma coloração ligeiramente amarelada. Os compostos presentes foram identificados recorrendo a técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear protónica (RMN ¹H) e de carbono de (RMN ¹³C), de infravermelho (IV) e cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS). O espectro de RMN ¹H e o cromatograma do GC-MS encontram-se representados nas figuras 7 e 8, respetivamente, e os restantes espectros de IV e RMN ¹³C foram colocados em anexo. Alguns dados relativos aos espectros estão descritos na Tabela

2. Os dados do GC-MS revelam a presença de três compostos isoméricos, apresentando tempos de retenção diferentes, mas com espectros de massa idênticos. A integração dos sinais na região dos aromáticos ($\delta = 7-8$ ppm) do RMN ^1H , e a determinação das constantes de acoplamento J , confirmam a presença de uma mistura de três regioisômeros aromáticos, *orto*, *para* e *meta*.

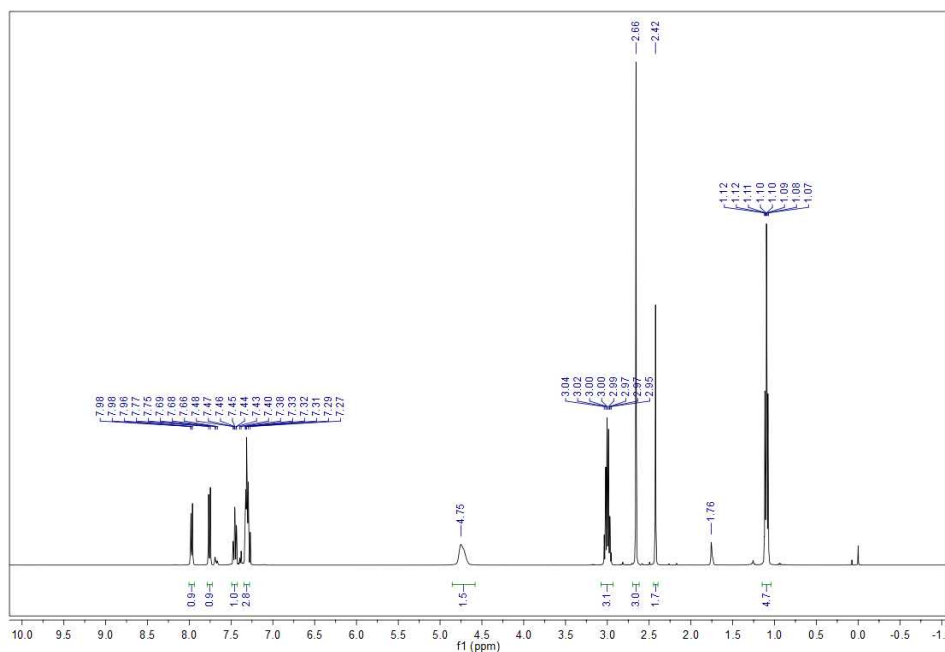


Figura 7: Espectro de RMN ^1H dos compostos isolados do extrato orgânico, obtido em clorofórmio deuterado (CDCl_3) a 400 MHz.

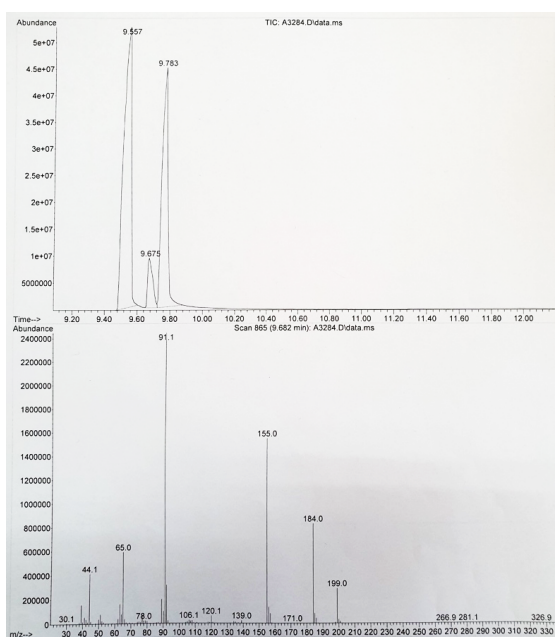


Figura 8: Cromatograma e espectro de massa correspondente ao pico com tempo de retenção de 9.67 min, obtido num GC-MS com ionização por impacto eletrônico.

Tabela 2: Dados da análise espectroscópica do extrato orgânico.

| RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ / ppm | RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ / ppm | IV ν _{max} / cm ⁻¹ | GC-MS tempo de retenção / min (m/z) |
|--|---|---|---|
| 7.97 (d, J = 8.2 Hz, 2H, Ar-H, isómero <i>para</i>), 7.76 (d, J = 8.2 Hz, 2H, Ar-H, isómero <i>para</i>), 7.69-7.66 (m, 2H, Ar-H, isómero <i>meta</i>), 7.48-7.43 (m, 1H, Ar-H, isómero <i>orto</i>), 7.40-7.38 (m, 2H, Ar-H do isómero <i>meta</i>), 7.33-7.27 (m, 3H, Ar-H do isómero <i>meta</i>), 4.75 (s, 1H, NH, mistura dos 3 isómeros), 3.04-2.96 (m, 2H, CH ₂ CH ₃ , mistura dos 3 isómeros), 2.66 (s, 3H, Me, isómero <i>orto</i>), 2.42 (s, 3H, Me, mistura de isómeros <i>meta</i> e <i>para</i>), 1.12-1.07 (m, 3H, CH ₂ CH ₃ , mistura dos 3 isómeros) | 143.3, 139.8, 139.3, 138.0, 137.1, 137.0, 133.4, 132.8, 132.7, 132.5, 129.7, 129.5, 128.9, 127.4, 127.1, 126.1, 124.2, 38.3, 38.2, 38.0, 21.5, 21.3, 20.3, 15.2, 15.0 | 3284, 2978, 2938, 2877, 1597, 1314, 1154 | 9.56 (199), 9.67 (199), 9.78 (199) |

4. Discussão

Este projeto de investigação veio dar continuidade a estudos realizados anteriormente pelo grupo de trabalho,⁸ nos quais foram avaliados diferentes materiais utilizados na terapêutica de proteção pulpar direta. Idealmente, o biomaterial utilizado nesta técnica, para além de aderir à superfície dentária e garantir um correto selamento, não deve ser reabsorvível, tóxico, carcinogénico ou genotóxico, devendo apresentar biocompatibilidade e bioatividade.³ O facto de o material Life[®] ter demonstrado elevada citotoxicidade quando comparado com outros biomateriais,⁸ motivou a realização de estudos com o objetivo de identificar o componente responsável por essa morte celular, tendo em conta a composição apresentada pelo fabricante.

Assim, na fase inicial do trabalho, foram reproduzidos os resultados obtidos previamente. Através da realização de ensaios de MTT verificou-se que, para a exposição ao Life[®], na concentração de 50%, a atividade metabólica foi residual, tanto para meio como para a solução condicionada. Estes resultados, para além de permitirem confirmar o efeito citotóxico do material na cultura celular MDPC-23, também garantiram a viabilidade da metodologia adotada neste trabalho, em que foi necessário obter uma solução condicionada

por incubação do biomaterial em água ultrapura, de modo a viabilizar os estudos de química subsequentes.

O ensaio de MTT determina a atividade metabólica e é amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de um biomaterial. No entanto, este por si só torna-se insuficiente visto que a diminuição da atividade metabólica não resulta necessariamente de morte celular. Esta pode ser provocada por um estímulo que limite o metabolismo celular, tornando-se necessária a realização de estudos complementares. Neste caso realizou-se um ensaio que permite avaliar a viabilidade celular, como o teste de exclusão do Azul de Tripano. Assim, para células expostas ao Life[®], na concentração de 50%, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular para valores próximos do zero, sendo significativa após as 120 horas, quando comparado com a avaliação às 24 horas. Deste modo, os resultados deste ensaio permitiram garantir que a diminuição da atividade metabólica estaria associada a morte celular.

De notar que, se um material é tóxico *in vitro*, pode não revelar necessariamente elevada citotoxicidade *in vivo*. Contudo, existe evidência na literatura em como os materiais à base de hidróxido de cálcio se encontram associados a menores taxas de sucesso, quando comparados com outros biomateriais utilizados na técnica de proteção pulpar direta.^{2,3,18,19}

Assim, o objetivo do trabalho passou pela identificação das substâncias tóxicas presentes no biomaterial responsáveis pela citotoxicidade já verificada. Neste contexto, realizou-se, em primeiro lugar, uma separação líquido-líquido, entre a água ultrapura condicionada e acetato de etilo, com o intuito de extrair os componentes orgânicos do meio aquoso.

Os extratos das duas fases foram avaliados nas células MDPC-23, em condições idênticas, tendo sido realizados os ensaios de MTT e do Azul de Tripano. Não se observou citotoxicidade com o extrato da fase aquosa. No entanto, comprovou-se que os constituintes orgânicos seriam responsáveis pela citotoxicidade, visto que se verificou uma diminuição significativa da atividade metabólica e viabilidade celular, para concentrações iguais ou superiores a 25%.

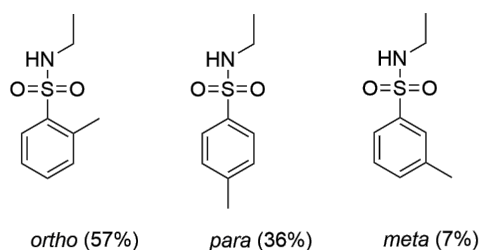
Recorreu-se aos métodos espectroscópicos com o intuito de identificar os constituintes da fração orgânica. Pela análise do RMN ¹H (Figura 7 e Tabela 2) constatou-se, devido aos sinais com desvios químicos na região 7-8 ppm, a presença de compostos aromáticos na fração orgânica. Numa primeira análise, e tendo em conta a composição do Life[®], descrita pelo fabricante, avaliou-se presença de derivados do salicilato de metilo. No entanto, no espectro de RMN ¹³C (Anexo I e Tabela 2) verifica-se a ausência de grupos carbonilos. A inexistência de picos no intervalo de desvios típicos do carbono destes grupos funcionais, entre 160-200 ppm, veio contrariar a hipótese inicial. Adicionalmente, a presença de uma banda no espectro de IV (Anexo II e Tabela 2) a 3284 cm⁻¹, característica dum grupo NH,

contribuiu para excluir a associação entre os compostos presentes no extrato orgânico e os indicados pelo fabricante.

O cromatograma de GC-MS (Figura 8, Tabela 2) revelou a presença de três compostos, apresentando tempos de retenção diferentes, 9.56, 9.67 e 9.78, mas com espectros de massa idênticos e com o pico do íon molecular $m/z = 199$.

De facto, por análise das bulas farmacêuticas do Life[®], constatou-se a presença de um composto não descrito na bula europeia (Anexo IV), mas referido na bula americana (Anexo V), a N-etil-toluenosulfonamida (Esquema 2). Foi possível identificar os compostos presentes no extrato orgânico como uma mistura dos regioisómeros *orto*, *para* e *meta* da N-etil-toluenosulfonamida (NETSA). Os espectros de IV e de massa encontram-se concordantes com os descritos na literatura para o NETSA.²⁰

As percentagens de cada isómero foram obtidas a partir das áreas dos sinais referentes a cada um no cromatograma do GC-MS, sendo de 57, 36 e 7% para *orto*, *para* e *meta*, respetivamente. A sua atribuição foi efetuada com base no espectro de RMN ¹H. Os sinais correspondentes aos 4 prótons do grupo aromático do isómero *para* surgem como dois dubletos para desvios químicos a 7.97 e 7.76 ppm, enquanto que os do isómero *orto* surgem como multipletos a 7.48-7.43 e 7.33-7.27 ppm.



Esquema 2: Estrutura química dos regioisómeros *orto*, *para* e *meta* da N-etil-toluenosulfonamida (NETSA), cuja fórmula é $C_9H_{13}NO_2S$. São ainda apresentadas a percentagens dos isómeros presentes no extrato orgânico obtidas por GC-MS.

O NETSA, como mistura dos seus regioisómeros, é usado como agente plastificante em resinas, acetato de celulose, nitrocelulose, lacas, adesivos, tintas e, como consequência, têm-se verificado a sua presença como contaminante em águas e produtos alimentares.²¹ Apesar dos dados escassos sobre as propriedades toxicológicas destes compostos, encontra-se reportado algum efeito mutagénico²² e, por isso, deve constituir motivo de preocupação a sua utilização.

Assim, através da realização deste projeto, determinou-se pela primeira vez, quais os compostos responsáveis pela morte celular associada ao Life[®]. Dado o sucesso clínico moderado deste biomaterial, estes resultados permitem que novos materiais, tendo como

base a sua composição, possam ser desenvolvidos com características de biocompatibilidade melhoradas. Como perspectiva futura, poderá ser estudada a substituição do NETSA por outros agentes plastificantes de base natural, com propriedades melhoradas e sem riscos para a saúde humana.²³

5. Conclusão

O presente trabalho permitiu confirmar a toxicidade do Life[®] nas células MDPC-23, corroborando estudos anteriores, bem como identificar a N-Etil-o/p/m-toluenosulfonamida como o agente responsável pela sua citotoxicidade.

Para além disso, estes resultados tornaram evidente a necessidade de um maior rigor e restrição quanto à descrição da constituição de biomateriais dentários, principalmente em relação à presença de compostos residuais que possam influenciar a biocompatibilidade do produto. Em casos em que, tal como o Life[®], o produto final resulte da mistura de duas pastas, torna-se imperativo a descrição dos compostos resultantes da reação entre os componentes iniciais, visto que estes poderão apresentar citotoxicidade.

Apesar de já existirem biomateriais com características melhoradas, o Life[®] continua a ser amplamente utilizado na prática clínica. Assim sendo e tendo em conta os resultados obtidos, a aplicação deste produto não será recomendada.

6. Agradecimentos

À Doutora Ana Cristina Santos pelo equipamento de luz ultravioleta necessário para a esterilização dos *pellets*. Ao Professor Francisco Caramelo pelo esclarecimento de dúvidas em relação à análise estatística. À Fundação para a Ciência e Tecnologia, pelo financiamento (FEDER COMPETE 2020-EU) ao Centro de Química de Coimbra (CQC) e CNC.IBILI pelos projetos POCI-01-0145-FEDER-007630 e POCI-01-0145-FEDER-007440, respetivamente. Ao Instituto de Clínica Integrada e ao Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina, e ao Departamento de Química da Universidade de Coimbra, em especial ao Grupo de Química Orgânica liderado pela Prof. Teresa Pinho e Melo, por disponibilizarem os meios necessários para a concretização deste projeto.

7. Referências Bibliográficas

1. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*. 2010;98(1):2–14.
2. Paula AB, Laranjo M. DIRECT PULP CAPPING : WHAT IS THE MOST EFFECTIVE THERAPY ? — SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. 2018;1–17.
3. da Rosa WLO, Cocco AR, Silva TM d., Mesquita LC, Galarça AD, Silva AF d., et al. Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2018;106(3):1358–68.
4. Cabrera C, Silva CI, Ormeño A, Mercade M, Brizuela C, Cabezas R, et al. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2017;43(11):1776–80.
5. Hilton TJ, Ferracane JL, Mancl L. Comparison of CaOH with MTA for Direct Pulp Capping: A PBRN Randomized Clinical Trial. *J Dent Res*. 2013;92(July 2013):S16–22.
6. Khademi A, Akhlaghi N. Outcomes of vital pulp therapy in permanent teeth with different medicaments based on review of the literature. *Dent Res J (Isfahan)*. 2015;12(5):406.
7. M.S. M, P.R. W, H. S. Outcome of Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate: A Prospective Study. *J Endod [Internet]*. 2015;41(7):1026–31. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L616572633%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.024%0Ahttp://limo.libis.be/resolver?&sid=EMBASE&issn=18783554&id=doi:10.1016%2Fj.joen.2015.02.024&atitle=Outcome+of+Direct+Pulp+>
8. Paula A, Laranjo M, Marto CM, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Gonçalves AC, et al. Biodentine™ Boosts, WhiteProRoot® MTA Increases and Life® Suppresses Odontoblast Activity. *Materials (Basel)*. 2019;12(7):1184.
9. Stanley HR, Lundy T. Dycal therapy for pulp exposures. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1972;34(5):818–27.
10. Examiner P, Merriam AEC. United States patent. Geothermics [Internet]. 1985;14(4):595–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0375650585900112>
11. ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009;
12. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Dagna A, Colombo M, Chiesa M. Biocompatibility of a

- new pulp capping cement. :69–76.
13. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*. 2006;27(14):2865–73.
 14. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod*. 2005;31(5):387–91.
 15. Ranjkesh B, Isidor F, Kraft DCE, Løvschall H. *In vitro* cytotoxic evaluation of novel fast-setting calcium silicate cement compositions and dental materials using colorimetric methyl-thiazolyl-tetrazolium assay. *J Oral Sci*. 2018;60(1):82–8.
 16. Wei W, Qi YP, Nikonov SY, Niu LN, Messer RLW, Mao J, et al. Effects of an experimental calcium aluminosilicate cement on the viability of murine odontoblast-like cells. *J Endod*. 2012;38(7):936–42.
 17. Poggio C, Arciola CR, Beltrami R, Monaco A, Dagna A, Lombardini M, et al. Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. *Sci World J*. 2014;2014.
 18. Zhu C, Ju B, Ni R. Clinical outcome of direct pulp capping with MTA or calcium hydroxide: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* [Internet]. 2015;8(10):17055–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26770296><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4694196>
 19. Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. *J Endod*. 2015;41(9):1412–7.
 20. Benzenesulfonamide, N-ethyl-4-methyl- [Internet]. National Institute of Standards and Technology, NIST Livro de Química na Web, SRD 69. Available from: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C80397&Type=IR-SPEC&Index=1#IR-SPEC>; <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C80397&Mask=200#Mass-Spec>
 21. Skjevrak I, Brede C, Steffensen IL, Mikalsen A, Alexander J, Fjeldal P, et al. Non-targeted multi-component analytical surveillance of plastic food contact materials: Identification of substances not included in EU positive lists and their risk assessment. *Food Addit Contam*. 2005;22(10):1012–22.
 22. Scientific Committee for Food Safety N, for mattrygghet V. Risk assessment of N-ethyl-toluenesulfonamide (NETSA) used as plasticizer plasticizer in printing inks on food packaging materials [Internet]. 2008. 1–31 p. Available from: www.vkm.no
 23. Vieira MGA, Da Silva MA, Dos Santos LO, Beppu MM. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur Polym J*. 2011;47(3):254–63.

8. Abreviaturas, símbolos e fórmulas

ANOVA: *Analysis of variance*

DMEM: *Dulbecco's modified eagle médium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

FBS: *Fetal bovine sérum*

ISO: *International Organization for Standardization*

MDPC-23: Mouse dental papilla cell -23

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

NETSA: *N-etil-toluenosulfonamida*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PVC: *Polyvinyl Chloride*

TLC: do inglês *Thin Layer Chromatography*

Ar: *Grupo arilo*

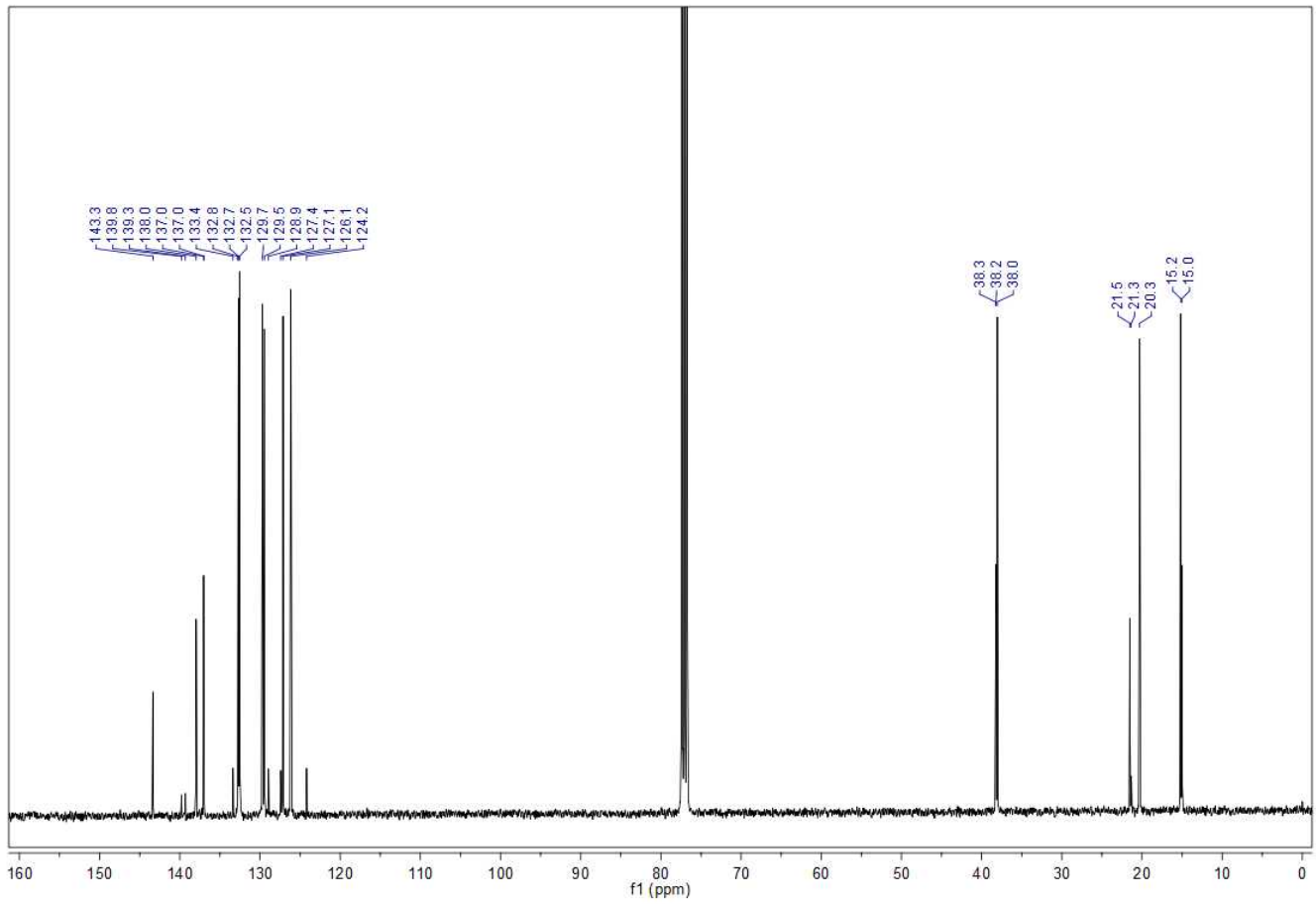
J: *Constante de acoplamento*

GC-MS: do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

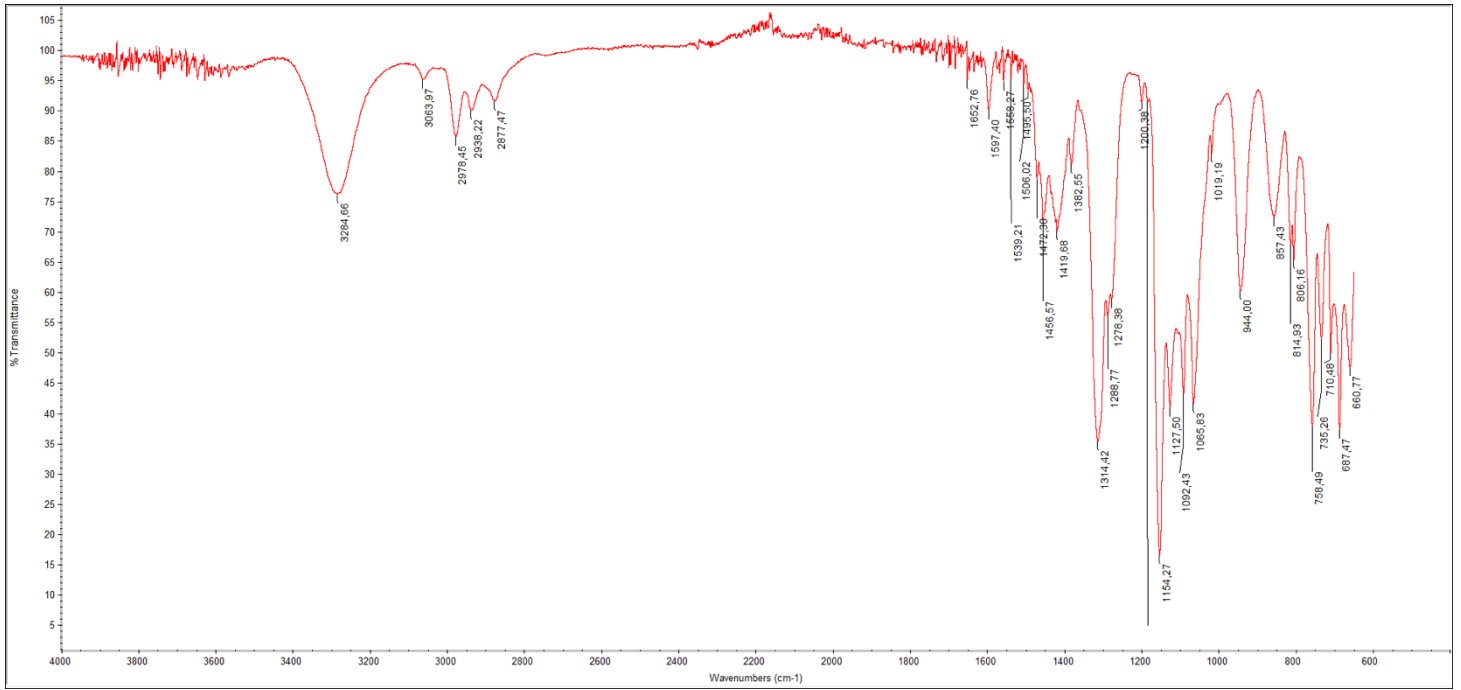
IV: *Espectroscopia de Infravermelho*

RMN: *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*

Anexo I – Espectro de RMN ^{13}C



Anexo II - Espectro de infravermelho



Anexo III – Material utilizado

| Material utilizado | Lote | Data de validade | Marca Comercial |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|
| Life® | LOT 6775374 LOT 6880919 | 2020-03-31 2020-05-31 | Kerr |

Anexo IV – Composição do biomaterial Life[®], segundo a bula farmacêutica europeia



Ficha de dados de segurança Life Base

SECÇÃO 1: IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA/MISTURA E DA SOCIEDADE/EMPRESA

1.1. Identificador do produto

Nome do produto : Life Base

1.2. Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Utilizações identificadas relevantes

Categoria de uso principal : Uso profissional
Função ou categoria de utilização : Materiais odontológicos.

Usos desaconselhados

Não existe informação adicional disponível

1.3. Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Fornecedor

Kerr Italia S.r.l.
Via Passanti, 332
84018 Scafati (SA) - Italy
T +39-081-850-8311
E-mail: safety@kerrhawe.com

Fabricante

Kerr Italia S.r.l.
Via Passanti, 332
84018 Scafati (SA) - Italy
T +39-081-850-8311
E-mail: safety@kerrhawe.com

Pessoa de contacto : safety@kerrhawe.com - tel. 00-800-41-050-505 (08.00-17.00)

1.4. Número de telefone de emergência

Número de emergência : CHEMTREC® Emergency Call Center. Emergency Telephone Number (for USA only) 001-800-424-9300 International and Maritime Telephone Number +1 (703) 527-3887

| País | Organismo/Empresa | Morada | Número de emergência |
|----------|----------------------------------|--|----------------------|
| Portugal | Centro de Informação Antivenenos | Rua Almirante Barroso, 36 1000-013 Lisboa | +351 808 250 143 |

SECÇÃO 2: IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS

2.1. Classificação da substância ou mistura

Classificação de acordo com o regulamento (CE) n° 1272/2008 [CLP]

Aquatic Chronic 2 H411

Texto completo das categorias de classificação e das advertências H: consultar a Secção 16

2.2. Elementos do rótulo

Rotulagem de acordo com o Regulamento (CE) n° 1272/2008 [CLP]

Pictogramas de perigo (CLP) :



GHS09

Palavra-sinal (CLP) :

-

Advertências de perigo (CLP) :

H411 - Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros

Recomendações de prudência (CLP) :

P273 - Evitar a libertação para o ambiente
P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente em uma instalação de recolha de resíduos autorizada

Frases adicionais :

Este produto é um dispositivo médico livre (Regulamento (CE) N.o 1907/2006, artigo 2º, parágrafo 6): Dispositivos médicos, tal como definidos nas Directivas 90/385/CEE e 93/42/EEC, invasivos ou utilizados em contacto directo com o corpo, e dispositivos médicos definidos na Directiva 98/79/CE.

2.3. Outros perigos

Outros riscos que não contribuem para a classificação : Nenhum(as) em condições normais.

Esta substância/mistura não preenche os critérios PBT do regulamento REACH, Anexo XIII.

Esta substância/mistura não preenche os critérios mPmB do regulamento REACH, Anexo XIII.

SECÇÃO 3: COMPOSIÇÃO/INFORMAÇÃO SOBRE OS COMPONENTES**3.1. Substância**

Não aplicável

3.2. Mistura

| Nome | Identificador do produto | % | Classificação de acordo com o regulamento (CE) nº 1272/2008 [CLP] |
|--|---|-------------|---|
| óxido de zinco | (nº CAS) 1314-13-2 (nº CE) 215-222-5 (Número de índice) 030-013-00-7 (Nº REACH) 01-2119463881-32 | >=12 - <=17 | Aquatic Acute 1, H400 Aquatic Chronic 1, H410 |
| calcium hydroxide | (nº CAS) 1305-62-0 (nº CE) 215-137-3 (Nº REACH) 01-2119475151-45 | >=3 - <=6 | Skin Irrit. 2, H315 Eye Irrit. 2, H319 |
| óxido de cálcio substância com valor(es) limite de exposição profissional nacional(ais) (PT) | (nº CAS) 1305-78-8 (nº CE) 215-138-9 (Nº REACH) 01-2119475325-36 | | Nao classificado |

Texto integral das frases H: ver a secção 16.

SECÇÃO 4: PRIMEIROS SOCORROS**4.1. Descrição das medidas de primeiros socorros**

Primeiros socorros geral : Caso sinta indisposição, contacte um centro de informação antivenenos ou um médico.

Primeiros socorros em caso de inalação : Enxaguar nariz e boca com água. Conseguir assistência médica caso qualquer mal-estar continue.

Primeiros socorros em caso de contacto com a pele : Lavar suavemente com sabonete e água abundantes. Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.

Primeiros socorros em caso de contacto com os olhos : Enxaguar imediatamente com água por pelo menos 15 minutos. Assegurar-se de que removeu eventuais lentes de contacto dos olhos antes de enxaguar. Caso a irritação ocular persista: Consulte um médico.

Primeiros socorros em caso de ingestão : Enxaguar nariz, boca e garganta com água. Conseguir assistência médica caso qualquer mal-estar continue.

4.2. Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados

Sintomas/lesões : Em caso de indisposição, consultar um médico.

4.3. Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários

Não existe informação adicional disponível

SECÇÃO 5: MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIOS**5.1. Meios de extinção**

Agentes extintores adequados : Água pulverizada. Dióxido de carbono. Pó seco.

Agentes extintores inadequados : Não usar uma corrente de água forte.

5.2. Perigos especiais decorrentes da substância ou mistura

Perigo de incêndio : Não inflamável.

Perigo de explosão : O produto não é explosivo.

Produtos de decomposição perigosos em caso de incêndio : Nenhum Produto desintegrável perigoso específico notificado.

5.3. Recomendações para o pessoal de combate a incêndios

Instruções para extinção de incêndio : Remover os recipientes para longe da área de incêndio se isso puder ser feito sem risco. Eliminar todas as fontes de ignição se tal puder ser feito em segurança.

Protecção durante o combate a incêndios : Não entrar na área em chamas sem equipamento protector adequado, incluindo protecção respiratória.

SECÇÃO 6: MEDIDAS A TOMAR EM CASO DE FUGAS ACIDENTAIS**6.1. Precauções individuais, equipamento de protecção e procedimentos de emergência**

Procedimentos gerais : Não é necessário em condições de uso normais.



Ficha de dados de segurança LIFE CATALYST

SECÇÃO 1: IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA/MISTURA E DA SOCIEDADE/EMPRESA

1.1. Identificador do produto

Nome do produto : LIFE CATALYST

1.2. Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Utilizações identificadas relevantes

Categoria de uso principal : Uso profissional
Função ou categoria de utilização : Materiais odontológicos.

Usos desaconselhados

Não existe informação adicional disponível

1.3. Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Fornecedor

Kerr Italia S.r.l.
Via Passanti, 332
84018 Scafati (SA) - Italy
T +39-081-850-8311
[E-mail: safety@kerrhawe.com](mailto:safety@kerrhawe.com)

Fabricante

Kerr Italia S.r.l.
Via Passanti, 332
84018 Scafati (SA) - Italy
T +39-081-850-8311
[E-mail: safety@kerrhawe.com](mailto:safety@kerrhawe.com)

Pessoa de contacto : safety@kerrhawe.com - tel. 00-800-41-050-505 (08.00-17.00)

1.4. Número de telefone de emergência

Número de emergência : CHEMTREC® Emergency Call Center. Emergency Telephone Number (for USA only) 001-800-424-9300 International and Maritime Telephone Number +1 (703) 527-3887

| País | Organismo/Empresa | Morada | Número de emergência |
|----------|----------------------------------|--|----------------------|
| Portugal | Centro de Informação Antivenenos | Rua Almirante Barroso, 36 1000-013 Lisboa | +351 808 250 143 |

SECÇÃO 2: IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS

2.1. Classificação da substância ou mistura

Classificação de acordo com o regulamento (CE) n° 1272/2008 [CLP]

Acute Tox. 4 (Oral) H302
Eye Dam. 1 H318

Texto completo das categorias de classificação e das advertências H: consultar a Secção 16

2.2. Elementos do rótulo

Rotulagem de acordo com o Regulamento (CE) n° 1272/2008 [CLP]

Pictogramas de perigo (CLP) :



GHS05

GHS07

Palavra-sinal (CLP) : Perigo
Componentes perigosos : O salicilato de metilo, 2,2-dimetilpropano-1,3-diol
Advertências de perigo (CLP) : H302 - Nocivo por ingestão
H318 - Provoca lesões oculares graves
Recomendações de prudência (CLP) : P264 - Lavar as mãos, os antebraços e a cara cuidadosamente após manuseamento
P270 - Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.
P280 - Usar protecção ocular, luvas de protecção
P301+P312 - EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um médico, um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS

P305+P351+P338+P310 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um médico
 P330 - Enxaguar a boca
 P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente em ...

Frases adicionais : Este produto é um dispositivo médico livre (Regulamento (CE) N.º 1907/2006, artigo 2º, parágrafo 6): Dispositivos médicos, tal como definidos nas Directivas 90/385/CEE e 93/42/EEC, invasivos ou utilizados em contacto directo com o corpo, e dispositivos médicos definidos na Directiva 98/79/CE.

2.3. Outros perigos

Outros riscos que não contribuem para a classificação : Nenhum(as) em condições normais.

Esta substância/mistura não preenche os critérios PBT do regulamento REACH, Anexo XIII.

Esta substância/mistura não preenche os critérios mPmB do regulamento REACH, Anexo XIII.

SECÇÃO 3: COMPOSIÇÃO/INFORMAÇÃO SOBRE OS COMPONENTES

3.1. Substância

Não aplicável

3.2. Mistura

| Nome | Identificador do produto | % | Classificação de acordo com o regulamento (CE) nº 1272/2008 [CLP] |
|-----------------------------|---|----------|---|
| O salicilato de metilo | (nº CAS) 119-36-8 (nº CE) 204-317-7 (Nº REACH) 01-2119515671-44 | =>35-<50 | Acute Tox. 4 (Oral), H302 |
| sulfato de bário | (nº CAS) 7727-43-7 (nº CE) 231-784-4 (Nº REACH) 01-2119491274-35 | =>35-<50 | Nao classificado |
| dióxido de titânio | (nº CAS) 13463-67-7 (nº CE) 236-675-5 (Nº REACH) 01-2119489379-17 | =>10-<15 | Nao classificado |
| 2,2-dimetilpropano-1,3-diol | (nº CAS) 126-30-7 (nº CE) 204-781-0 (Nº REACH) 01-2119480396-30 | =>5-<10 | Eye Dam. 1, H318 |

Texto completo das frases H, ver secção 16

SECÇÃO 4: PRIMEIROS SOCORROS

4.1. Descrição das medidas de primeiros socorros

Primeiros socorros geral : Colocar a vítima ao ar livre. Se for necessário consultar um médico, mostre-lhe a embalagem ou o rótulo.

Primeiros socorros em caso de inalação : Retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

Primeiros socorros em caso de contacto com a pele : Lavar suavemente com sabonete e água abundantes. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Primeiros socorros em caso de contacto com os olhos : Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Consulte imediatamente um médico.

Primeiros socorros em caso de ingestão : Em caso de ingestão, lavar rapidamente a boca com água (apenas se a vítima estiver consciente). NÃO provocar o vômito. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

4.2. Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados

Sintomas/lesões em caso de contacto com a pele : Rubores, dor. Borbulhas.

Sintomas/lesões em caso de contacto com os olhos : Provoca lesões oculares graves. Rubores, dor.

Sintomas/lesões em caso de ingestão : Nocivo por ingestão. Pode causar uma ligeira irritação dos tecidos da boca, garganta e tracto gastrointestinal.

4.3. Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários

Inexistência de medidas específicas identificadas.

SECÇÃO 5: MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIOS

5.1. Meios de extinção

Agentes extintores adequados : Utilizar os meios adequados para combater os incêndios circunvizinhos. Espuma, dióxido de carbono (CO2) e pó.

Anexo V – Composição do biomaterial Life[®], segundo a bula farmacêutica americana

Section 1. Identification

GHS product identifier : LIFE BASE (Regular & Fast)

Other means of identification : Not available.

Product type : Paste.

Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Product use : Dental cavity liner and pulp capping agent.

Area of application : Professional applications.

Manufacturer : **Kerr Corporation**
1717 West Collins Avenue
Orange, CA 92867-5422
Telephone no.: 1-800-KERR-123

e-mail address of person responsible for this SDS : edwin.varela@kavokerrgroup.com

Emergency telephone number (with hours of operation) : CHEMTREC® (24 hours) U.S. : 1-800-424-9300 International: +1-703-527-3887

Section 2. Hazards identification

OSHA/HCS status : This material is considered hazardous by the OSHA Hazard Communication Standard (29 CFR 1910.1200).

Health effects are based on the uncured material.

Classification of the substance or mixture : SKIN IRRITATION - Category 2
SERIOUS EYE DAMAGE - Category 1
SPECIFIC TARGET ORGAN TOXICITY (SINGLE EXPOSURE) (Respiratory tract irritation) - Category 3
Percentage of the mixture consisting of ingredient(s) of unknown toxicity: 17.3%

GHS label elements

Hazard pictograms :



Signal word : Danger

Hazard statements : Causes serious eye damage.
Causes skin irritation.
May cause respiratory irritation.

Precautionary statements

Prevention : Wear protective gloves. Wear eye or face protection. Use only outdoors or in a well-ventilated area. Avoid breathing dust. Wash hands thoroughly after handling.

Section 2. Hazards identification

| | |
|---|---|
| Response | : IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing. Call a POISON CENTER or physician if you feel unwell. IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. Take off contaminated clothing. Wash contaminated clothing before reuse. If skin irritation occurs: Get medical attention. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER or physician. |
| Storage | : Store locked up. |
| Disposal | : Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations. |
| Supplemental label elements | : Do not taste or swallow. Wash thoroughly after handling. |
| Hazards not otherwise classified | : Causes digestive tract burns. |

Section 3. Composition/information on ingredients

| | |
|--------------------------------------|------------------|
| Substance/mixture | : Mixture |
| Other means of identification | : Not available. |

CAS number/other identifiers

| | |
|---------------------|-------------------|
| CAS number | : Not applicable. |
| Product code | : Not available. |

| Ingredient name | Other names | % | CAS number |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------|------------|
| calcium dihydroxide | calcium dihydroxide | 30-60 | 1305-62-0 |
| N-ethyl-o(or p)-toluenesulphonamide | N-ethyl-o(or p)-toluenesulphonamide | 30-60 | 8047-99-2 |
| zinc oxide | zinc oxide | 10-30 | 1314-13-2 |
| Calcium oxide | calcium oxide | 1-5 | 1305-78-8 |

Any concentration shown as a range is to protect confidentiality or is due to batch variation.

There are no additional ingredients present which, within the current knowledge of the supplier and in the concentrations applicable, are classified as hazardous to health and hence require reporting in this section.

Section 4. First aid measures

Description of necessary first aid measures

| | |
|---------------------|--|
| Eye contact | : No special measures are required. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water. Get medical attention if symptoms occur. |
| Inhalation | : No special measures required. If inhaled, remove to fresh air. Get medical attention if symptoms occur. |
| Skin contact | : No special measures required. In case of contact, immediately flush skin with plenty of water. Get medical attention if symptoms occur. |
| Ingestion | : Wash out mouth with water. If material has been swallowed and the exposed person is conscious, give small quantities of water to drink. Stop if the exposed person feels sick as vomiting may be dangerous. Get medical attention if adverse health effects persist or are severe. |

Most important symptoms/effects, acute and delayed

Potential acute health effects

| | |
|--------------------|--|
| Eye contact | : Causes serious eye damage. |
| Inhalation | : May cause respiratory irritation. Exposure to decomposition products may cause a health hazard. Serious effects may be delayed following exposure. |

Section 1. Identification

GHS product identifier : LIFE CATALYST
Other means of identification : Not available.
Product type : Paste.

Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Product use : Dental cavity liner and pulp capping agent.
Area of application : Professional applications.

Manufacturer : **Kerr Corporation**
 1717 West Collins Avenue
 Orange, CA 92867-5422
 Telephone no.: 1-800-KERR-123

e-mail address of person responsible for this SDS : edwin.varela@kavokerrgroup.com

Emergency telephone number (with hours of operation) : CHEMTREC® (24 hours) U.S. : 1-800-424-9300 International: +1-703-527-3887

Section 2. Hazards identification

OSHA/HCS status : This material is considered hazardous by the OSHA Hazard Communication Standard (29 CFR 1910.1200).

Classification of the substance or mixture : ACUTE TOXICITY (oral) - Category 4
 SERIOUS EYE DAMAGE - Category 1
 Percentage of the mixture consisting of ingredient(s) of unknown toxicity: 37.8%

GHS label elements

Hazard pictograms :



Signal word : Danger

Hazard statements : Harmful if swallowed.
 Causes serious eye damage.

Precautionary statements

Prevention : Wear eye or face protection. Do not eat, drink or smoke when using this product.
 Wash hands thoroughly after handling.

Response : IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or physician if you feel unwell. Rinse mouth. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER or physician.

Storage : Not applicable.

Disposal : Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

Date of issue/Date of revision : 01/06/2015 **Date of previous issue** : No previous validation **Version** : 1 **1/10**

Section 2. Hazards identification

Hazards not otherwise classified : None known.

Section 3. Composition/information on ingredients

Substance/mixture : Mixture

Other means of identification : Not available.

CAS number/other identifiers

CAS number : Not applicable.

Product code : Not available.

| Ingredient name | Other names | % | CAS number |
|------------------------------|------------------------------|-------|------------|
| methyl salicylate | methyl salicylate | 30-60 | 119-36-8 |
| 2,2-dimethylpropane-1,3-diol | 2,2-dimethylpropane-1,3-diol | 5-10 | 126-30-7 |

Any concentration shown as a range is to protect confidentiality or is due to batch variation.

There are no additional ingredients present which, within the current knowledge of the supplier and in the concentrations applicable, are classified as hazardous to health and hence require reporting in this section.

Section 4. First aid measures

Description of necessary first aid measures

- Eye contact** : No special measures are required. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water. Get medical attention if symptoms occur.
- Inhalation** : No special measures required. If inhaled, remove to fresh air. Get medical attention if symptoms occur.
- Skin contact** : No special measures required. In case of contact, immediately flush skin with plenty of water. Get medical attention if symptoms occur.
- Ingestion** : Wash out mouth with water. If material has been swallowed and the exposed person is conscious, give small quantities of water to drink. Stop if the exposed person feels sick as vomiting may be dangerous. Get medical attention if adverse health effects persist or are severe.

Most important symptoms/effects, acute and delayed

Potential acute health effects

- Eye contact** : Causes serious eye damage.
- Inhalation** : May give off gas, vapor or dust that is very irritating or corrosive to the respiratory system.
- Skin contact** : No known significant effects or critical hazards.
- Ingestion** : Harmful if swallowed. May cause burns to mouth, throat and stomach.

Over-exposure signs/symptoms

- Eye contact** : Adverse symptoms may include the following:
pain
watering
redness
- Inhalation** : No specific data.
- Skin contact** : Adverse symptoms may include the following:
pain or irritation
redness
blistering may occur

