



Universidade Estadual Paulista – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara

Cristiane Campos Costa

*Avaliação in vitro da citotoxicidade
de resinas acrílicas para
reembasamento baseadas em uma
nova formulação.*

Araraquara
2009

Universidade Estadual Paulista - UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara

Cristiane Campos Costa

*Avaliação in vitro da citotoxicidade de
resinas acrílicas para reembasamento
baseadas em uma nova formulação.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral – Área de Prótese

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo
Co-Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara
2009

Costa, Cristiane Campos

Avaliação in vitro da citotoxicidade de resinas acrílicas para reembasamento baseadas em nova formulação / Cristiane Campos Costa. – Araraquara: [s.n.], 2009.

119 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

Co-orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

1. Teste de biocompatibilidade 2. Reembasamento de dentadura
3. Resinas acrílicas 4. Polimetil metacrilato I. Título

Cristiane Campos Costa

*Avaliação in vitro da citotoxicidade de resinas acrílicas para
reembasamento baseadas em uma nova formulação.*

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof^a Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

2º Examinador: Prof^a Dra. Renata Cristina Silveira Rodrigues Ferracioli

3º Examinador: Prof^a Dra. Ana Cláudia Pavarina

Araraquara, 19 de março de 2009.

Dados Curriculares

Cristiane Campos Costa

Nascimento	01 de dezembro de 1982
Filiação	Maurício Ramos Costa Dircelei Ferreira de Campos Costa
2003 – 2006	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2007	Estágio de docência na disciplina de Prótese Parcial Removível Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2008	Estágio de docência na disciplina de Prótese Parcial Removível Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2007 – 2009	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Prótese Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedicatória

A Deus

Por me proporcionar a oportunidade de cursar o mestrado, por capacitar-me a realizá-lo, por sempre ter direcionado meus passos para que minha caminhada fosse mais segura, por renovar minhas forças e esperança em momentos de dificuldades, por estar presente na minha vida, e por seu eterno amor por mim.

Meu reconhecimento e gratidão.

Aos meus pais Maurício e Dircelei

A vocês que sempre estiveram ao meu lado, que me proporcionaram os ensinamentos mais importantes da minha vida, que acreditaram nos meus sonhos e me apoiaram incondicionalmente. Agradeço pelo incentivo, compreensão, dedicação e acima de tudo pelo amor e carinho que sempre me cercaram. Amo muito vocês.

Minha eterna gratidão!

Dedico a vocês esta conquista.

Ao meu irmão e amigo Leandro

Por estar sempre presente em minha vida, mesmo a distância,
pelo carinho, apoio, por torcer por mim e vibrar comigo a cada
nova etapa alcançada.

Dedico a você este trabalho.

Ao meu noivo André, amor da minha vida

Pelo amor, carinho, dedicação, incentivo, motivação, paciência
nos momentos de estresse, apoio, por ser um verdadeiro
companheiro, por tornar minha caminhada mais leve e fazer
minha vida mais feliz. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Te amo muito!

Dedico a você esta conquista com amor!

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos,

A Prof^a Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

Os meus mais sinceros agradecimentos pela orientação, auxílio na minha formação profissional, dedicação, atenção, pelos ensinamentos científicos, paciência, competência, responsabilidade, pela oportunidade e apoio na realização desse trabalho.

A Prof^a Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Agradeço a orientação e a disponibilização do laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof^o Carlos Eduardo Vergani

Agradeço pela disponibilização em ajudar, pelos conhecimentos científicos a mim transmitidos e pela valiosa contribuição na elaboração deste trabalho.

As Professoras Doutoradas Ana Lúcia e Ana Cláudia

Por participarem da minha trajetória, pelos conhecimentos científicos, apoio e convivência.

A querida amiga Carol

Muito obrigada por dividir comigo as dúvidas e as dificuldades no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço seu carinho, disposição em ajudar, as diversas trocas de informações e artigos sobre citotoxicidade, e principalmente pela amizade. Carol, conhecer e trabalhar com você foi grande privilégio.

Muito obrigada!

Os meus agradecimentos especiais a todos vocês.

Agradecimientos

Agradecimentos

À coordenadoria do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral

Pela oportunidade e apoio na realização desse trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral

Pelos ensinamentos, atenção, apoio e amizade.

Aos meus amigos do curso de Pós-Graduação

Ana Lúcia, Ana Paula, André, Antônio, Camilinha, Carol, Carlos

Eduardo, Fabiana, Flávia M., Flávia Z., Fernanda, Lali, Patrícia,

Rodrigo, Tati, pela amizade, companheirismo, convivência e

aprendizado.

Aos funcionários do departamento de Materiais Dentários e

Prótese

Pela amizade, convivência, dedicação, atenção e

disponibilização em ajudar.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação

Pela atenção, dedicação, compreensão, educação, que sempre
demonstraram.

*Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de
Araraquara*

Pelo carinho, amizade, disposição em ajudar, paciência e
atenção.

*A Marisa, técnica do laboratório de Imunologia da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas – UNESP*

Agradeço a atenção, paciência, aprendizado, dedicação,
esforço e empenho, sem os quais seria muito difícil a
realização deste trabalho.

A Capes e a Fapesp

Agradeço pela bolsa de estudos concedida para a realização
deste trabalho.

Sumário

Sumário

Resumo.....	16
Abstract.....	19
Introdução.....	22
Revisão da Literatura.....	28
Proposição.....	63
Material e Método.....	65
Resultado.....	85
Discussão.....	91
Conclusão.....	101
Referências.....	103
Apêndices.....	117

Resumo

Costa, CC. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de resinas acrílicas para reembasamento baseadas em uma nova formulação [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2009.

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar a citotoxicidade *in vitro* de duas resinas reembasadoras experimentais autopolimerizáveis contendo alta concentração de agentes de ligação cruzada, etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e 1,4-butanodiol dimetacrilato (BDMA) comparadas com uma resina reembasadora comercial (Tokuyama Rebase Fast II). Foram confeccionados corpos-de-prova em forma de discos das três resinas acrílicas reembasadoras rígidas sob condições assépticas. Os fibroblastos (L929) foram cultivados em placas com 96 compartimentos e incubadas por 24 h em meio de cultura Eagle. Os extratos foram preparados, colocando-se três amostras de cada resina em frascos de vidro estéreis com 9 mL de meio de Eagle e incubadas a 37° C por 24 h. O efeito citotóxico dos extratos foram avaliados utilizando os testes de incorporação do ³H-timidina e MTT, que refletem os níveis de síntese de DNA e metabolismo celular, respectivamente. Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando análise de variância

($P < 0.05$). Para o teste de incorporação do ^3H -timidina, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0.05$) entre os materiais. A média da quantidade do isótopo incorporado no DNA celular para todas as resinas acrílicas foi estatisticamente menor do que para o controle. Todas as resinas acrílicas foram classificadas pelo teste de incorporação do ^3H -timidina como moderadamente citotóxicas. Da mesma forma, para o teste do MTT, não foi encontrada diferença significativa para a citotoxicidade entre os materiais ($P > 0.05$). Quando a citotoxicidade foi comparado com o grupo controle, todas as resinas foram classificadas entre não citotóxicas e discretamente citotóxicas pelo teste do MTT. Assim, conclui-se que a incorporação dos agentes de ligação cruzada, EGDMA e BDMA não influenciaram significativamente sobre a citotoxicidade observada. Não houve diferença entre a viabilidade celular para os materiais avaliados em ambos os testes.

Palavras-chaves: Testes de biocompatibilidade, reembasamento de dentadura, resinas acrílicas, polimetil metacrilato.

Abstract

Costa, CC. In vitro cytotoxicity evaluation of reline acrylic resins based on new formulation. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2009.

Abstract

The aim of this study was to determine the cytotoxicity in vitro of two trials autopolymerizing reline systems made with higher concentration of cross-linking agents, EGDMA and BDMA compared to a commercial reline resin. Sample disks of the three hard reline acrylic resins were fabricated under aseptic conditions. The Fibroblast L929 cells were cultured in 96-well plates and incubated for 24 h in Eagle's medium. Eluates were prepared by placing three samples into a sterile glass vial with 9 mL of Eagle's medium and incubating at 37°C for 24 h. The cytotoxic effect from the eluates was evaluated using the 3H-thymidine incorporation and MTT assays, which reflect DNA synthesis levels and cell metabolism, respectively. The data were statistically analyzed by using the one-way analysis of variance ($P < .05$). With the 3H-thymidine incorporation assay, no significant differences ($P > .05$) were found between the materials. The mean quantity of isotope incorporated into cellular DNA for all acrylic resins was statistically smaller than for the control. All acrylic resins were graded by the 3Hthymidine incorporation assay as moderate cytotoxic. Similarly, with the MTT assay, no significant

difference in cytotoxicity was found between the materials ($P > .05$). When the cytotoxicity was compared with control group, all resins assay were between non cytotoxic and slight cytotoxic by the MTT. The incorporation of cross-linking agents, EGDMA and BDMA had no significant influence on the cytotoxicity observed. There was no cell viability difference between all materials in both assays.

Keywords: Biocompatibility assays, denture base reline, acrylic resins, polymethyl methacrylate.

Introdução

1 Introdução

Em função da reabsorção óssea do rebordo, decorrente da extração dentária, as bases das próteses devem ser periodicamente readaptadas aos tecidos subjacentes para a manutenção das condições de retenção e estabilidade obtidas inicialmente. Essa readaptação pode ser realizada no próprio consultório, utilizando-se resina acrílica autopolimerizável especialmente formulada para essa finalidade. Entre as principais vantagens desse procedimento, poder-se-ia destacar a facilidade e a rapidez de execução. Apesar dessas vantagens, vários produtos apresentam sabor desagradável e alguns podem causar sensação de queimação na mucosa. Isto pode ser atribuído ao monômero residual presente no material após a polimerização¹⁹.

Considerando que os materiais reembasadores ficam em contato direto com a fibromucosa que reveste o rebordo residual, suas propriedades mecânicas, físicas e biológicas deveriam ser similares ou superiores às das resinas termopolimerizáveis empregadas na confecção de bases de próteses. Contudo, os reembasadores apresentam diferentes composições químicas^{3, 67} e, conseqüentemente, a estrutura final do polímero pode variar consideravelmente, produzindo diferentes comportamentos e biocompatibilidade. Esses materiais são oferecidos na forma de um pó, composto de polietil metacrilato (PEMA), enquanto a composição do líquido varia. Os monômeros normalmente utilizados são metil metacrilato, etil metacrilato ou isobutil metacrilato, sendo os principais componentes do líquido.

Durante a polimerização, os monômeros de baixo peso molecular são rapidamente transformados em uma cadeia polimérica sólida de alto peso molecular, mas essa reação nunca é completa e, portanto, monômero residual permanece dentro do sistema¹³. Estudos têm mostrado que, por causa do processo de polimerização, há maior conteúdo de monômero residual nas resinas autopolimerizadas do que nas termopolimerizadas^{54,62,70,35,31}. A razão para isso é o baixo grau de conversão alcançado pelo uso dos ativadores químicos, em oposição aos utilizados pela ativação térmica⁶⁹. Tem sido relatado que monômero residual em uma resina acrílica dental tem efeitos deletérios sobre muitas das suas propriedades, tais como a sorção de água³, dureza^{26, 27}, estabilidade dimensional^{43,12}, resistência à tração^{77,16}, resistência flexural^{27, 36, 77, 70, 72}, e biocompatibilidade^{44,60, 74, 20, 40, 63, 41, 69, 28,59,12,48,65}. Estudos in vitro têm demonstrado que o monômero residual é tóxico^{56,29,30,12,31}. Estudos clínicos indicaram os monômeros como uma das possíveis causas de alterações como inflamação, eritema, dor, ulceração, erosão, prurido, inchaço, edema labial e sensação de queimação na mucosa bucal dos usuários de prótese^{21,9,52}. Somado a isso, essas reações locais podem desenvolver hipersensibilização alérgica, desencadeando reações sistêmicas aos materiais acrílicos³⁹. As resinas acrílicas apresentam ainda em sua composição ftalatos e estéres de ácidos carboxílicos aromáticos, os quais são utilizados como plastificantes^{41, 59}, além da formação de subprodutos tais como ácido metacrílico, ácido benzóico, fenil benzoato, fenil salicilato, bifenil e o formaldeído^{1, 32, 33, 40, 62, 41,42,59}.

Muitos autores têm discutido o processo de polimerização envolvido na conversão de monômero em polímero, uma vez que adequada polimerização é

um fator crucial para maximizar as propriedades físicas e a biocompatibilidade das resinas acrílicas^{18,70,6}. Vários métodos para a redução do conteúdo de monômero residual e, conseqüentemente, da citotoxicidade de resinas acrílicas foram descritos^{63, 77, 57,29, 30, 7, 12, 31}.

Ainda, alguns pesquisadores têm proposto o uso de novos monômeros com aumento de agentes de ligação cruzada e a redução do conteúdo de monômero de metacrilato de metila na formulação desses materiais com a finalidade de reduzir o monômero residual³⁴. Agentes de ligação cruzada bifuncionais têm sido adicionados ao monômero^{4,75,2}, por serem considerados menos tóxicos que os monofuncionais pela sua menor volatilidade e por apresentarem menor difusão nos tecidos biológicos⁵⁸. Entretanto, estudos têm demonstrado que esses monômeros bifuncionais e seus subprodutos liberados podem apresentar potencial efeito citotóxico^{29,12}.

Apesar das deficiências apontadas pelos estudos citados, as resinas autopolimerizáveis são materiais de extrema importância na readaptação de base de próteses no tratamento de pacientes idosos pela rapidez do procedimento.

Levando em conta que novas formulações poderiam propiciar materiais com melhores propriedades mecânicas, biocompatibilidade e menor custo, dois sistemas de resinas autopolimerizáveis foram desenvolvidos. Esses sistemas de resina consistem basicamente de polietil metacrilato (PEMA) e uma mistura de etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e 1,4 butanodiol dimetacrilato, substâncias essas consideradas biocompatíveis^{10,11,22, 50}. EGDMA e BDMA formam um grupo de agentes de ligação cruzada bifuncional que têm sido usados para melhorar ou modificar as propriedades dos materiais

poliméricos utilizados nas áreas biológicas, médicas, farmacêuticas e nas aplicações ambientais⁶⁵. A adição desses agentes de ligação cruzada na resina acrílica poderia aumentar a copolimerização do metil metacrilato com um monômero mais reativo com a finalidade de permitir que a polimerização fosse continuada, resultando em menor conteúdo de monômero residual. Isto seria positivo não apenas para a biocompatibilidade, mas também as propriedades mecânicas e a durabilidade do material iriam melhorar.

Para garantir a segurança no uso de novos materiais, testes de citotoxicidade *in vitro* foram desenvolvidos como um teste preliminar para avaliar a biocompatibilidade do material^{74, 20}. Atualmente, estudos sobre a biocompatibilidade de materiais odontológicos incluem os clássicos testes citotóxicos e as investigações sobre as interações entre materiais e células hospedeiras para explicar melhor as causas de efeitos adversos, por vezes observadas clinicamente⁴⁸. Diferentes parâmetros são usados para monitorar os efeitos citotóxicos dos materiais, tais como inibição do crescimento celular, citólise, marcadores de membrana ou citoplasmáticos e as mudanças na atividade metabólica⁵. Outros testes biológicos comumente utilizados para avaliar a citotoxicidade são a quantificação da síntese do DNA por incorporação do ³H-timidina^{64, 61, 73, 24, 66} e a análise do metabolismo por meio da quebra do sal de metiltetrazolium (MTT) pela desidrogenase succinica presente nas mitocondriais de células vivas em cristais de formazan azul^{14, 47, 51}.

Com base nessas considerações, o objetivo deste estudo foi determinar a citotoxicidade *in vitro* de duas resinas reembasadoras autopolimerizáveis

desenvolvidas com alta concentração de agentes de ligação cruzada (EGDMA e BDMA) em comparação com uma resina comercial.

Revisão da Literatura

2 Revisão da Literatura

Sabendo que o formaldeído é um dos responsáveis por causar injúrias na mucosa oral dos pacientes portadores de próteses, Ruyter⁵³, em 1980, avaliou a liberação e a origem do formaldeído de resinas acrílicas para bases de próteses. Para o estudo, foram confeccionados corpos-de-prova com 50 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura com resinas termopolimerizáveis (Paladon 65, Swe Base e SR 3/60), resinas autopolimerizáveis do tipo pó (Palacast, Swe Flow e Ivocast) e autopolimerizáveis tipo massa (Palapress, Swebond Compact e Quick 20), de acordo com as instruções dos fabricantes. Os corpos-de-prova foram, então, tratados para que o formaldeído fosse liberado em solução. As soluções contendo formaldeído foram analisadas por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Também foi verificada a composição de monômeros líquidos de cada resina, a quantidade de oxigênio dissolvido em cada monômero e a formação de formaldeído por meio da reação entre o oxigênio e o monômero. Os resultados mostraram que a quantidade de formaldeído liberada pelas resinas termopolimerizáveis foi menor do que a quantidade liberada pelas resinas autopolimerizáveis. Em relação à composição, as resinas autopolimerizáveis apresentaram diferentes tipos de monômeros líquidos com respectivos agentes de ligações cruzadas. Os resultados mostraram, ainda, que, após 4 semanas a 37°C, a reação entre metil metacrilato e

oxigênio formou uma mistura contendo monômero metil metacrilato, metil piruvato, formaldeído e copolímero oxigênio-metil metacrilato, confirmando os resultados de estudos prévios que mostram que o formaldeído é decorrente da reação entre o oxigênio e o monômero residual.

Mosmann⁴⁶, em 1983, descreveu o teste do MTT para avaliar a citotoxicidade por meio da mensuração da atividade mitocondrial da célula, interpretado por meio do espectrofotômetro (leitor de ELISA). De acordo com o autor a o teste do MTT, utilizado na análise quantitativa colorimétrica, possui diversas vantagens para avaliar o número e a atividade de células vivas. O teste da redução do MTT pode ser aplicado para todos os tipos de células, visto que o MTT pode ser quebrado por todas as células metabolicamente ativas, exceto células mortas e eritrócitos. A quantidade de cristais de formazan gerados está diretamente relacionada ao número de células ativas. Assim, as células ativas produzem mais cristais de formazan do que as células em repouso, o que permite a medição de ativação mesmo na ausência de proliferação, ou seja, a quebra ocorre apenas em mitocôndrias ativas. Este teste apresenta como vantagens a mensuração de grande número de amostras com elevado grau de precisão, e a rapidez com que as amostras são processadas, podendo ser lida em alguns minutos após a diluição dos cristais de formazan pelo isopropanol. Os resultados também podem ser

observados visualmente, o que é útil e rápido na análise qualitativa dos resultados.

Price⁴⁹, em 1986, analisou o efeito da adição de 8 tipos de agentes de ligação cruzada (de acordo com o comprimento da cadeia e flexibilidade) nas concentrações de 10% e 50% sobre a resistência ao impacto de uma resina termopolimerizável à base de polimetil metacrilato. Os resultados deste estudo mostraram que, a resistência ao impacto foi reduzida com o aumento da concentração do agente de ligação cruzada de cadeia curta. Notou-se menor resistência ao impacto quando agentes de ligação cruzada com cadeias curtas eram utilizados, como por exemplo, o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA). Agente de ligação cruzada com cadeias mais longas, porém menos flexíveis, como o 1,6-hexametilenoglicol dimetacrilato (1,6 HMGDMA), em concentrações de até 25%, não produziu efeito sobre a resistência ao impacto. A incorporação dos agentes de ligação com cadeias longas e flexíveis, como o tetraetilenoglicol dimetacrilato e o polietilenoglicol 600 dimetacrilato, em concentrações de 50%, melhorou significativamente a resistência ao impacto. Assim para os autores, a maior flexibilidade das moléculas estaria relacionada à presença de átomos de oxigênio nas cadeias moleculares. Desta forma, foi possível concluir que o tamanho das cadeias moleculares dos agentes de ligação cruzada apresentou menor efeito sobre a resistência ao impacto da resina em comparação com o aumento da flexibilidade da cadeia.

Sendo a liberação de substâncias químicas pelas resinas acrílicas um dos possíveis fatores responsáveis pelas estomatites causadas por próteses, Koda et al.³³, em 1990, realizaram um estudo com o objetivo de analisar quantitativamente o metacrilato de metila e outras substâncias liberadas por resinas acrílicas imersas em saliva artificial com diferentes pHs (de ácido a neutro). Corpos-de-prova com 8,5 mm de diâmetro e 2 mm de altura foram preparados com uma resina autopolimerizável (Rebaron nº 3), uma termopolimerizável (Acron nº 8) e uma polimerizada por meio de microondas (Acron MC nº 8), de acordo com as instruções dos fabricantes. Os discos de resina foram colocados em frascos tampados contendo 5 ml de saliva artificial e incubados em água aquecida a 37°C. A saliva artificial apresentava variação no pH (4, 5, 6 e 6.8) de acordo com a quantidade de solução aquosa de ácido fosfórico adicionada. A cromatografia líquida foi utilizada para determinar a quantidade de substâncias químicas liberadas pelos corpos-de-prova na saliva artificial em diferentes pHs. Os resultados mostraram que o ácido benzóico, ácido metacrílico, metacrilato de metila e acrilato de metila foram identificados pela cromatografia líquida com boa resolução, tendo sido o ácido benzóico, o metacrilato de metila e o ácido metacrílico liberados por todas as resinas. Além disso, ocorreu maior liberação de substâncias químicas pelas resinas autopolimerizáveis do que pelas termopolimerizáveis e polimerizadas por microondas. De uma maneira geral, a quantidade de metacrilato de metila, ácido benzóico e ácido

metacrílico aumentou de acordo com o tempo de incubação. Em relação ao pH, a concentração de metacrilato de metila foi maior nas soluções com pH mais baixo (4.0), devido à hidrólise dessa substância, a qual resulta na queda da sua concentração. Com o aumento do pH, ocorreu maior concentração de ácido metacrílico e menor concentração de ácido benzóico. Assim, concluiu-se nesse estudo que as variações de pH da saliva podem influenciar na citotoxicidade das resinas acrílicas.

Pelo fato dos testes de citotoxicidade *in vitro* apresentarem um grande número de métodos e materiais, as normas da International Standard Organization²⁵ (ISO) 10993-5(1992) padronizam esses testes e selecionam o método para análise da citotoxicidade mais apropriado para cada material testado. Com isso, três categorias de testes foram listadas: o teste que utiliza extratos, o teste onde há o contato direto do material testado com as células utilizadas e o teste onde o contato é indireto, por meio da difusão em ágar ou filtros Millipore. Os diferentes métodos que avaliam a citotoxicidade dos materiais testados podem ser agrupados em categorias de acordo com o tipo de análise, tais como a avaliação dos danos pela morfologia celular, medida das células danificadas, medida do crescimento celular e medida de aspectos específicos do metabolismo celular. Os grupos controle negativo e positivo são bem definidos nessas normas, sendo o primeiro responsável por não provocar citotoxicidade, como, por exemplo, discos de polietileno e o segundo responsável por promover a citotoxicidade, como o polivinilclorido. Quando da produção

de extratos, alguns tempos e temperaturas são recomendados, sendo que na temperatura de 37°C, o tempo não deve ser menor do que 24 horas. Além disso, a média entre a superfície do corpo-de-prova e o volume do meio utilizado para a extração deve estar entre 6 cm²/ml e 0,5 cm²/ml. O tipo de célula L 929 é uma das linhagens recomendadas pela ISO 10993-5 para a realização dos testes de citotoxicidade. Contudo, a citotoxicidade dos materiais testados pode ser determinada quantitativamente, por meio da verificação do número de colônias, proliferação ou inibição celular ou qualitativamente, pela utilização da microscopia, onde são observadas a morfologia, vacuolização e lise celular.

Sendo o formaldeído um dos agentes responsáveis pelas injúrias na mucosa bucal, Tsuchiya et al.⁶², em 1993, realizaram um estudo com o objetivo de quantificar, através da análise de injeção de fluxo, o formaldeído liberado pelas resinas acrílicas para bases de próteses polimerizadas por diferentes métodos. Assim, corpos-de-prova com 8,5 mm de diâmetro e 2 mm de altura foram confeccionados, de acordo com as instruções dos fabricantes, utilizando-se uma resina autopolimerizável (Rebaron nº 3), uma termopolimerizável (Acron nº 8) e uma polimerizada por meio de microondas (Acron MC nº 8). Os discos foram colocados em frascos de vidro com 2 ml de água destilada e imersos em água a 37°C. Alíquotas de 50 a 70µl foram coletadas em diferentes intervalos de tempo e analisadas pelo método da injeção de fluxo. Para elucidar a influência do tempo na quantidade de substâncias

liberadas, discos de resina autopolimerizável foram colocados em frascos contendo 2 ml de saliva artificial e incubados a 37°C, sendo que para alguns desses discos, a camada de inibição foi removida. A cada dia, a quantidade de formaldeído e de metacrilato de metila era determinada pela análise da injeção de fluxo e pela cromatografia líquida. Em seguida, esses discos de resina autopolimerizável eram enxaguados com água e nova alíquota de 2 ml de saliva artificial era colocada no frasco diariamente após cada análise. Os resultados demonstraram que as amostras coletadas dos corpos-de-prova imersos em água acumularam maior quantidade de formaldeído liberado de acordo com o tempo, ou seja, a quantidade de formaldeído foi maior na amostra coletada em 10 dias do que em 5 e 1 dia para a resina autopolimerizável. As amostras, onde foi removida a camada de inibição dos discos de resina autopolimerizável, liberaram menor quantidade de formaldeído quando comparadas às outras amostras de resina autopolimerizável. Os discos de resina termopolimerizável liberaram pequena quantidade de formaldeído, sendo ainda menor para os discos de resina polimerizada por meio de microondas. Os resultados indicaram que esse método de análise é muito específico para quantificar o formaldeído liberado. Os corpos-de-prova imersos na saliva artificial, para determinar a influência do tempo na liberação de produtos pela resina acrílica autopolimerizável, mostraram que quanto maior o tempo transcorrido, menor a quantidade de produtos liberados. Após um dia de imersão, a liberação de

formaldeído foi reduzida a metade, tendo sido a liberação de metacrilato de metila também maior no primeiro dia. A provável causa da formação do formaldeído liberado neste estudo é a oxidação do monômero residual metacrilato de metila. Dessa forma, o formaldeído liberado pode estar relacionado com a diferença de potencial alérgico entre as resinas autopolimerizáveis e termopolimerizáveis, uma vez que as resinas autopolimerizáveis liberam maior quantidade de monômero residual.

Lefebvre et al.³⁶, em 1994, realizaram um estudo para examinar o efeito das substâncias liberadas por 4 resinas para bases de próteses fotopolimerizáveis (Triad, Triad High Flow, Astron LC Hard e Extoral) e uma resina termopolimerizável (Lucitone 199) sobre células epiteliais orais de hamster propagadas em meio de cultura DMEM acrescido de 5% de soro fetal bovino, 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ no ar. Três corpos-de-prova de cada resina acrílica, na forma de discos, foram confeccionados com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura de acordo com as instruções dos fabricantes, colocados em frascos de vidro com 9 ml de meio de cultura DMEM suplementado e levados para uma mesa giratória (100 rpm) por 24 horas. Após esse período, os discos foram transferidos para meio de cultura fresco aí permanecendo por 10 dias. As substâncias liberadas durante as primeiras 24 horas e durante os próximos 10 dias no meio de cultura foram utilizadas nos testes de citotoxicidade. Três mil células epiteliais de hamster, 50 µl de meio de cultura contendo as

substâncias liberadas e 50 µl de meio de cultura fresco foram colocados em placas de cultura com 96 orifícios para cada período e material testado. Para a análise da citotoxicidade, foi realizado o teste MTT que verifica a produção de enzima desidrogenase mitocondrial, sendo que essa produção é considerada reflexo do número de células viáveis. Dessa forma, quanto maior a atividade dessa enzima, maior será o número de células viáveis. Outro teste realizado neste estudo para a análise da citotoxicidade foi a monitorização da síntese de RNA. Os resultados mostraram que os componentes liberados pelas resinas acrílicas termo ou fotopolimerizáveis podem causar efeito tóxico às células epiteliais orais, sendo que nas primeiras 24 horas a inibição celular é maior. Além disso, diferentes substâncias podem ser liberadas em diferentes concentrações, alterando as propriedades físico-químicas desses materiais. O efeito citotóxico pode continuar após dias da polimerização, porém, este efeito pode ser minimizado se as próteses forem armazenadas em água por um período de 24 horas antes da colocação no paciente.

Tsuchiya et al.⁶³, em 1994 quantificaram o monômero metil metacrilato e de formaldeído liberados por resinas acrílicas em saliva humana e artificial, assim como sua citotoxicidade. Além disso, testaram um método simples para reduzir a liberação dessas substâncias. Foram confeccionados corpo-de-prova de 8,5 mm x 2mm a partir de uma resina autopolimerizável (Rebaron n°3), uma termopolimerizada (Acron n° 8) e uma polimerizada em microondas (Acron MC n°8). Parte foi inserida em

saliva humana e parte em saliva artificial. A liberação de formaldeído foi analisada pela injeção de escoamento. A análise da citotoxicidade para o formaldeído e metil metacrilato foi realizada colocando-se estas substâncias sobre a cultura celular e incubadas a 37° C por 2, 3 e 5 dias. Como controle foi utilizado células não expostas às substâncias. Os resultados demonstraram que o formaldeído produziu efeito citotóxico mesmo em baixas concentrações, quando comparado com o monômero. Na tentativa de reduzir esse efeito, os autores avaliaram a efetividade da imersão em água por períodos de 10 a 60 minutos sobre os níveis de liberação das substâncias avaliadas. O efeito da imersão das resinas em água aquecida a 50°C sobre a liberação de monômero e do formaldeído também foi avaliado. Os resultados demonstraram que ocorreu maior liberação de substâncias pelas resinas autopolimerizáveis do que pelas termopolimerizadas ou por microondas. Quanto à citotoxicidade os produtos testados foram citotóxicos, entretanto o formaldeído precisou de menores concentrações para promover a citotoxicidade. Houve redução significativa na concentração de monômero residual e de formaldeído após imersão das resinas em água por uma hora, principalmente quando a água foi aquecida a 50°C. Assim, os autores sugeriram a imersão de materiais para base de prótese, principalmente as resinas autopolimerizáveis, antes da instalação para reduzir os efeitos adversos causados principalmente pelas resinas autopolimerizáveis.

Arima et al.³, em 1995, compararam neste estudo as propriedades de resistência flexural, absorção de água e solubilidade, em resinas para reembasamento imediato (Rebaron - Rb, Tokuso Rebase - TR, Mild - Mi, Metabase - Mb, Kooliner - KL, New Tru Liner - NTL), que apresentavam ou não agentes de ligação cruzada em sua composição, e uma resina acrílica termopolimerizável (Acron - Ac), utilizada para confecção de bases de prótese. A resina TR, autopolimerizável, contém em sua formulação alta taxa do agente de ligação cruzada 1,6-hexanediol dimetacrilato, e o monômero o β - metacrilóiloxietil propionato que tem duas ligações do tipo éster e forma cadeias poliméricas flexíveis, quando comparadas com o MMA ou o 2-etilhexil metacrilato. A resina KL, autopolimerizável, não tem em sua composição agentes de ligação cruzada ou plastificantes, e contém o monômero isobutil metacrilato. Após a realização dos testes para avaliação das propriedades destes materiais, pode-se constatar a partir dos resultados obtidos, que a resistência flexural das resinas acrílicas para reembasamento imediato foi significativamente menor que a do material termopolimerizável. As resinas com agentes de ligação cruzada, Mb, TR e Mi, apresentaram maiores valores de resistência flexural e de módulo de elasticidade, quando comparadas às resinas sem esses agentes (KL, NTL), exceto a resina Rb, que possui composição semelhante à da resina termopolimerizável (MMA). Assim, os materiais que possuíam agentes de ligação cruzada apresentaram valores de absorção de água significativamente menores

que a resina acrílica termopolimerizável Ac e que as resinas para reembasamento sem agentes de ligação cruzada. As resinas acrílicas para reembasamento imediato demonstraram, nos testes de solubilidade, valores significativamente maiores quando comparadas à resina Ac, exceto a resina Mb. As resinas KL e TR revelaram os valores de solubilidade mais altos. De acordo com os autores, este estudo revela a vantagem da adição de alta porcentagem de agentes de ligação cruzada no líquido das resinas acrílicas autopolimerizadas, uma vez que a composição do material está relacionada às suas propriedades.

Lygre et al.⁴¹, em 1995, realizaram um estudo com o objetivo de separar, identificar e quantificar os componentes orgânicos liberados in vitro de alguns polimetacrilatos de metila para base de próteses. Dessa forma, corpos-de-prova de uma resina termopolimerizável (Vertex 5RS) e duas autopolimerizáveis (Palpress Vario e Swebond Compact) foram confeccionados de acordo com as instruções dos fabricantes com 50 mm de diâmetro e 0,5 mm de altura. A resina termopolimerizável foi submetida a dois tipos de processamento, um com temperatura de 100°C por 65 minutos e o outro com temperatura de 80°C por 45 minutos, ambos sob compressão. A resina autopolimerizável Palpress Vario foi processada a uma temperatura de 55°C por 15 minutos e a Swebond Compact a 40°C por 10 minutos, ambas sob compressão de 0,2 MPa. Depois da confecção, os corpos-de-prova foram colocados em solução de Ringer (40,5 g de NaCl, 89 g de KCl, 1,125 g de CaCl₂, água destilada, pH=6,0)

por 7 dias ou em etanol por 20 horas para que ocorresse a liberação dos produtos. Vários testes foram utilizados para identificar e quantificar os produtos liberados pelas resinas, entre eles, a cromatografia a gás, a espectrometria de massa e a cromatografia líquida. Os resultados mostraram que várias substâncias são liberadas pelas resinas, como os componentes orgânicos, aditivos e outras substâncias incorporadas durante a manipulação ou decorrentes da degradação de produtos. Nesse estudo foi observado que há uma relação inversa entre a temperatura de processamento e a quantidade de produtos liberados, ou seja, quanto maior a temperatura de processamento, menor a quantidade de produtos liberados. Os autores destacaram que as resinas a base de polimetacrilato de metila liberam substâncias como o monômero metacrilato de metila, ácido metacrílico, ácido benzóico, difenil benzoato e formaldeído. Porém, os componentes responsáveis pelo efeito citotóxico das resinas para base de próteses ainda não foram totalmente identificados.

Arima et al.⁴, em 1996, investigaram o efeito da adição seis agentes de ligação cruzada (metil metacrilato (MMA), etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA), dietilenoglicol dimetacrilato (DEGMA), trietenoglicol dimetacrilato (TriEGDMA), 1,4-butanodiol dimetacrilato (1,4-BDMA), hexanodiol dimetacrilato (1,6-HDMA) e trimetilopropano trimetacrilato (TMPT)) ao líquido de uma resina autopolimerizável para base de prótese quanto a influência na sorção de água e a solubilidade.

Para isso concentrações de 20 a 80% foram adicionadas ao líquido da resina. Os resultados mostraram que a adição do 1,4-BDMA, o 1,6-HDMA, o EGDMA e o TMPT, promoveram a diminuição da sorção de água, proporcionalmente ao aumento de suas concentrações, ao passo que os agentes de ligação cruzada DEGMA e TriEGDMA apresentaram aumento dessa propriedade. Também foi observado uma tendência de diminuição da solubilidade da resina com o aumento das concentrações das substâncias 1,6-HDMA, DEGMA, TriEGDMA e TMPT. Segundo os autores, além da afinidade da molécula de água ao polímero e da densidade do agente de ligação cruzada, outros fatores como ligações duplas remanescentes, temperatura e método de polimerização também influenciam a sorção de água. Em relação à solubilidade foi mencionado que o PMMA não é solúvel em água, assim, a solubilidade observada no material é devido à dissolução de monômeros residuais e de iniciadores da reação. O monômero residual funciona como plastificante, diminuindo as propriedades mecânicas do material, e ainda pode causar reações teciduais desfavoráveis, se forem liberados para a cavidade oral. Assim concluiu-se que um valor alto de solubilidade não é desejável nas resinas para base de prótese.

O efeito citotóxico de resinas acrílicas sobre fibroblastos gengivais foi verificado por Sheridan et al.⁵⁶, em 1997. Para este estudo, foram confeccionados corpos-de-prova, em condições assépticas, com as resinas Acron MC (resina ativada por microondas), resina para reparo

Lucitone (ativada quimicamente) e Lucitone 199 (resina ativada pelo calor). Os corpos-de-prova, na forma de discos, apresentavam 12 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Segundo os autores, tal espessura corresponde a das próteses totais e parciais removíveis. Cada disco foi colocado dentro de uma placa e a ela foram adicionados 5 ml de meio de cultura α -MEM suplementado com 100 mg/ml de penicilina G, 50 mg/ml de sulfato de gentamicina e 0,1% de soro fetal bovino. Logo após a colocação do meio e após 24, 48, 72 e 96 horas, foram coletadas amostras contendo as substâncias liberadas pelos discos e nestas foi adicionada determinada concentração de fibroblastos gengivais cultivados previamente. Células cultivadas em meio de cultura α -MEM serviram como grupo controle negativo. O teste de citotoxicidade utilizado foi o MTS, o qual avalia a quantidade de células metabolicamente viáveis por meio da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial em comparação com o grupo controle. Os resultados deste estudo demonstraram que, dentre as resinas, a que apresentou maior efeito citotóxico foi a quimicamente ativada (Lucitone reparadora). Nas primeiras 24 horas, a resina ativada por meio de microondas foi a que apresentou menor efeito citotóxico. Entretanto, após 48, 72 e 96 horas, ela passou a ter efeito intermediário em relação às demais resinas. Nestes períodos, a resina ativada pelo calor é que apresentou menor efeito sobre as células. O efeito citotóxico foi maior nas primeiras 24 horas e diminuiu ao longo do tempo para todas as resinas testadas. Com isso, concluiu-se que o

armazenamento das próteses em água por longo período pode diminuir a citotoxicidade das substâncias liberadas e que as resinas acrílicas ativadas quimicamente são mais citotóxicas do que as outras.

Yoshi⁷⁶, em 1997, investigou a toxicidade de acrilatos e metacrilatos por meio de testes de citotoxicidade, e determinou a relação entre a citotoxicidade e a estrutura de monômeros resinosos. Para isso, Células HeLa foram cultivadas na densidade de 2×10^5 células/mL de EMEM em placas de 12 compartimentos (wells). Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi removido e 1 mL da solução de monômeros foi depositado sobre as células. As células permaneceram em contato com os monômeros por um período de 24 horas. O teste de MTT foi realizado para a avaliação da citotoxicidade dos materiais. Os resultados mostraram que todos os acrilatos foram mais tóxicos do que seus correspondentes metacrilatos. Em ambos, a presença do grupo hidroxil pareceu aumentar a toxicidade dos componentes. Quanto aos dimetacrilatos, os monômeros com quantidade igual ou inferior a 14 grupamentos de oxietilenos na cadeia demonstraram similar toxicidade, ao passo que dimetacrilatos com 23 oxietilenos revelaram baixa citotoxicidade. Os autores afirmam a importância de conhecer o nível de toxicidade relacionada à estrutura química, principalmente quando se trata de monômero, no desenvolvimento de novos materiais.

Vallittu et al.⁷⁰, em 1998, averiguaram o efeito da temperatura e do tempo de polimerização sobre o conteúdo de monômero residual de

duas resinas termopolimerizáveis (Pro Base Hot e Lucitone 199) e duas resinas autopolimerizáveis (Pro Base Cold e Palapress Vario). Foram confeccionados disco de 30 mm x 2mm e o ciclo de polimerização utilizados foram: resinas termopolimerizáveis: 1) 70°C por 90 minutos; 2) 70°C por 90 minutos mais o ciclo adicional a 100°C, nos tempos de polimerização (30, 60, 120, 180, 360, 720 ou 1440 minutos) e 3) a 100°C por um período de 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180, 360, 720 ou 1440 minutos. As resinas autopolimerizáveis foram polimerizadas sob pressão de 300 kPa e, submetidas ao banho em água a temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C, 55°C ou 60°C por 15 minutos. Após a polimerização cada amostra foi armazenada a $23\pm 1^\circ\text{C}$ em condições de umidade relativa de $50\pm 5\%$ por 3 dias. Para a avaliação do conteúdo do monômero residual das amostras foram submetidas à análise por cromatografia gasosa. Os resultados mostraram que o aumento da temperatura ente 30°C a 60°C e principalmente na faixa de 50°C a 60°C, promoveu diminuição no conteúdo de monômero residual para as resinas autopolimerizáveis. Para a resina termopolimerizada, o ciclo de polimerização de 70°C seguido da temperatura adicional de 100°C reduziu significativamente o conteúdo do monômero residual quando comparado com o ciclo de 70°C apenas. A termopolimerização apenas a 100°C a redução do monômero residual só foi observada com o aumento do tempo, o menor teor de monômero foi observado para as resinas termopolimerizadas a 100°C por 12 horas. Os dados obtidos desta análise, também mostraram que as resinas

autopolimerizáveis apresentaram maior conteúdo de monômero residual do que as termopolimerizáveis, e que as variáveis (tempo e temperatura) afetaram consideravelmente o conteúdo do monômero residual.

Sabendo que a reatividade do oxigênio com os radicais livres é maior que a dos radicais livres com os monômeros, a reação de polimerização é parcialmente inibida pelo oxigênio. Levando à formação de uma camada de resina não polimerizada que se chama de camada de inibição, Vallitu et al.⁷¹, em 1999, avaliaram a espessura da camada superficial não polimerizada da resina autopolimerizável a base de poli metil metacrilato (PMMA). Assim, para a confecção dos corpos-de-prova foi utilizada a proporção pó/líquido de 10/4, 10/5, 10/6, 10/7, 10/8, 10/9, 10/10, e a resina foi polimerizada a 55°C por 15 minutos, em contato com a água ou com o ar sob pressão atmosférica de 100 kPa e 300 kPa. Para cada grupo avaliado foram polimerizados cinco corpos-de-prova com espessura de 0,25mm ± 0,027mm. A espessura da camada superficial não polimerizada, ou seja, a profundidade da camada de inibição foi mensurada pela técnica de microscopia com luz polarizada. A profundidade da camada de inibição nos corpos-de-prova polimerizados em presença de ar sob pressão de 100 kPa variou de 39 a 174 µm, e os corpos-de-prova polimerizados sob pressão de 300 kPa apresentaram profundidade na camada de inibição de 91 a 391 µm. A proporção pó/líquido e a pressão de polimerização promoveram um efeito significativo na profundidade na camada de inibição (P <0,001). Por outro

lado, não foi observada nenhuma camada de inibição nos corpos-de-prova polimerizados em água. Clinicamente, com a finalidade de obter um adequado grau de polimerização na superfície da resina autopolimerizável a base de PMMA, o processo de polimerização deve ser realizado na água sempre que possível.

Wagner et al.⁷³, em 1999, compararam diferentes métodos para a análise da proliferação de linfócitos caninos, descreveram o teste MTT como sendo um método capaz de identificar a viabilidade celular por meio da enzima desidrogenase succínica, porém, não se mostrou preciso na identificação da proliferação de linfócitos caninos, sendo eficaz para isso, o teste da incorporação de ³H-timidina. Além disso, os autores citaram algumas desvantagens do teste ³H-timidina, como a necessidade de um equipamento especial de alto custo e a utilização de um material radioativo e que, apesar disso, tal teste tem sido amplamente utilizado na determinação da proliferação celular.

Yatabe et al.⁷⁵, em 1999, estudaram a deficiência na polimerização da camada superficial de seis resinas reembasadoras autopolimerizáveis resilientes. Foram utilizadas duas resinas convencionais a base de metil metacrilato e quatro com agentes de ligação cruzada bifuncionais. As resinas foram polimerizadas na presença de ar a 24 e 37°C e em água destilada a 37°C. E a proporção pó/líquido alterada $\pm 20\%$ da recomendada pelo fabricante. Em seguida cada amostra foi imersa em azul de metileno e armazenada por 3 semanas.

Posteriormente a inibição da polimerização da camada superficial foi avaliada em microscópio óptico. A partir dos resultados pode-se observar que nos materiais que apresentavam agentes de ligação cruzada, a camada não polimerizada foi reduzida nas condições de temperatura elevada, menor presença de oxigênio, e menor proporção pó/líquido. Foi observada uma pequena coloração na região polimerizada com a resina reembasadora convencional, enquanto que nenhuma coloração foi encontrada região de polimerização das resinas reembasadoras com agentes de ligação cruzada. A intensidade da inibição foi fortemente afetada pela temperatura, presença de ar, e viscosidade. As resinas que apresentam agentes de ligação cruzada são altamente polimerizadas, sendo, portanto mais difíceis de serem manchadas quando comparadas as resinas reembasadoras convencionais.

Tang et al.⁶¹, em 1999, compararam diferentes metodologias que avaliam a citotoxicidade dos materiais resinosos. Para isso, corpos-de-prova de alguns materiais resinosos foram confeccionados, de acordo com as instruções dos fabricantes, medindo 2 mm de espessura e 8 mm de diâmetro, os quais foram divididos em dois grupos: 1) corpos-de-prova com remoção da camada de inibição de oxigênio com acetona 99% e 2) corpos-de-prova sem remoção da camada de inibição de oxigênio. As amostras de cada grupo foram expostas a cultura de fibroblastos gengivais humanos por meio do contato direto (corpos-de-prova colocados sobre as células e células colocadas sobre os corpos-de-prova)

ou por contato indireto (corpos-de-prova colocados sobre membranas contendo poros e células em contato com os extratos dos corpos-de-prova). Discos de vidro estéreis, com as mesmas dimensões das amostras em resina serviram como grupo controle negativo para cada grupo experimental acima descrito. Para a análise da citotoxicidade, três testes foram realizados após 1, 3 e 6 dias de exposição: teste MTT, que avalia a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial, teste do vermelho neutro, que avalia o número de células mortas e o teste que avalia a viabilidade celular pela síntese de DNA por meio da incorporação de um radioisótopo (^3H -timidina). Os autores observaram que o contato direto dos discos de vidro com os fibroblastos causaram inibição do crescimento em comparação com as células cultivadas em contato indireto, tanto para o teste MTT como para o teste da incorporação de ^3H -timidina. Dessa forma, os autores concluíram que, apesar da necessidade do grupo controle, o contato direto dos discos de vidro com as células pode influenciar na viabilidade celular, não pela liberação de substâncias tóxicas, mas sim por fatores físicos. Além disso, os resultados mostraram que a remoção da camada de inibição de oxigênio dos corpos-de-prova reduziu a citotoxicidade dos materiais. O estudo mostrou, também, que o teste da incorporação de ^3H -timidina foi mais sensível do que o teste MTT. Assim, os autores concluíram que a utilização de diferentes métodos fornece informações mais completas sobre a citotoxicidade dos materiais resinosos.

O cimento ósseo ou polimetil metacrilato (PMMA) é um biomaterial sintético comumente utilizado para ancorar próteses cimentadas ao osso, porém, tem apresentado citotoxicidade em meio de cultura, e pode estar relacionado a problemas em longo prazo, sendo o monômero metacrilato de metila o principal responsável por este efeito. Assim, Bettencourt et al.⁸, 2000, avaliou em seu estudo dentre outros fatores a taxa de liberação de monômero residual durante a primeira hora após a polimerização com o objetivo de elucidar o mecanismo de liberação do monômero a partir da matriz polimérica. Para determinar a quantidade de monômero residual foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados deste estudo mostraram que os efeitos tóxicos do monômero não polimerizado estão relacionados ao fato de que a maior parte do monômero residual é liberada na primeira hora após a polimerização, seguido de uma liberação lenta e constante.

Imazato et al.²⁴, em 2000, utilizaram o teste da incorporação do radioisótopo ³H-timidina para a análise dos efeitos citotóxicos de alguns compósitos a base de monômeros mostrando, assim, a ampla utilização deste teste na determinação da proliferação celular. A incorporação da substância radioativa ao material genético ocorre apenas nas células que estão em proliferação. Dessa forma, uma inibição do crescimento pode ser verificada por meio da comparação com o grupo controle.

O estudo realizado por Lopes Jesus, et al.³⁸, em 2000, teve como objetivo esclarecer o comportamento dos polióis, bem como dos

compostos polifuncionais, que de forma geral apresentam interesses biológicos. Os autores afirmaram que butanodióis (que fazem parte do grupo dos compostos polifuncionais) formam um grupo de moléculas relativamente simples, cuja cadeia molecular principal dá origem a diferentes conformações, originando tanto moléculas polares como não polares. A distância entre os grupos polares varia de um isômero posicional para outro possibilitando ligações internas de hidrogênio com diferentes resistências.

Huang et al.²³, em 2001, avaliaram a citocompatibilidade de três diferentes extratos de resina para base de prótese e comparou os efeitos citotóxicos destes materiais na linhagem de células do epitélio oral humano KB e nos fibroblastos orais humanos primários derivados de mucosa bucal. Os extratos dos espécimes de resinas polimerizadas por calor, resinas autopolimerizadas, e resinas polimerizadas por luz, foram obtidos com meio de cultura por 1, 3 e 5 dias. A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio da redução do brometo de tetrazolio (MTT). Os extratos obtidos a partir das resinas para base de prótese autopolimerizáveis, termopolimerizáveis e polimerizadas por calor foram citotóxicas para a cultura dos fibroblastos orais humanos e para as células KB quando comparadas ao controle. A resina autopolimerizável foi considerada a mais tóxica dos materiais para base de prótese analisados para as duas culturas e a polimerizada por luz foi a menos citotóxica. Para as duas culturas celulares a citotoxicidade diminuiu na seguinte ordem:

autopolimerizável > termopolimerizável > polimerizada por luz. Os autores concluíram que os materiais testados e os sistemas utilizados de cultivo celular influenciam na citotoxicidade. Os autores ainda afirmaram que a utilização de células primárias e permanentes é recomendada para uma melhor análise dos efeitos citotóxicos das resinas para base de prótese.

Niu et al.⁴⁷, em 2001, avaliaram a efetividade de alguns testes colorimétricos baseados em reações enzimáticas, como o teste MTT. Segundo os autores, o teste baseado na reação da enzima desidrogenase succínica com o sal metil tetrazolium (MTT), tem sido usado na tentativa de se substituir os testes convencionais que utilizam materiais radioativos. Dentre as vantagens desse teste encontramos a simplicidade e a rapidez da técnica e a ausência de uma substância radioativa. Os autores relataram, ainda, que a viabilidade celular é dada por meio da atividade da enzima desidrogenase succínica. Essa enzima converte o sal MTT em cristais de formazan azuis, sendo a solução de formazan, após a dissolução dos cristais, lida em espectrofotômetro. Assim, quanto maior a intensidade da cor azul, maior o número de células viáveis.

Costa¹⁴, em 2001, descreveu uma metodologia de pesquisa para avaliação da citotoxicidade dos materiais odontológicos baseada na contagem de células, no metabolismo celular (teste MTT), na verificação do halo de inibição e na morfologia celular por meio da utilização da

microscopia eletrônica de varredura. Sabendo-se que os testes de citotoxicidade podem ser divididos em iniciais, secundários e pré-clínicos, o autor destacou que os resultados dos testes iniciais apresentam limitações quanto a sua correlação direta com a situação clínica, porém são muito importantes porque fornecem um rápido e consistente resultado com relação a sua atividade biológica. Além disso, grupos controle negativos e positivos são fortemente recomendados para que se faça a comparação com os resultados dos materiais em teste, tendo sido classificados os materiais, de acordo com a sua citotoxicidade, em não tóxico, discretamente tóxico, tóxico e severamente tóxico. O autor relatou, ainda, algumas vantagens e desvantagens dos testes de citotoxicidade. Dentre as vantagens, a possibilidade de tornar a metodologia dos testes padronizados reproduzível em diversos laboratórios de diferentes países, permitindo a comparação dos resultados obtidos. Outra vantagem do teste de citotoxicidade *in vitro*, quando comparado às investigações *in vivo*, é que os testes laboratoriais possibilitam a obtenção de resultados mais confiáveis devido à rara possibilidade de interferências técnicas. Além disso, o autor destacou que, apesar dos resultados obtidos a partir de testes de citotoxicidade não poderem ser de imediato extrapolado para as condições clínicas, foi relatado na literatura algum grau de correlação entre a citotoxicidade dos materiais *in vitro* e o efeito irritante *in vivo*, além de serem importantes para determinar o comportamento biológico dos materiais odontológicos.

O estudo realizado por Sideridou et al.⁵⁸, em 2002, teve por objetivo investigar a influência da estrutura química do dimetacrilatos mais comumente utilizados na composição das resinas odontológicas sobre o grau de conversão. De acordo com os autores as vantagens no uso de dimetacrilatos incluem menor contração, maior resistência, e de reduzida toxicidade devido à sua baixa volatilidade e menor difusão nos tecidos. Quanto a polimerização, dimetacrilatos polimerizados em temperatura ambiente geralmente resultam em uma resina de superfície vitrificada, indicando que apenas uma parte das duplas ligações disponíveis reagiu. Apenas monômeros muito flexíveis em que os grupos reativos do metacrilato são relativamente distantes podem reagir completamente em temperatura ambiente. O grau de conversão da resina é um fator importante que influencia suas propriedades físicas. Geralmente quanto maior o grau de conversão das duplas ligações maior a resistência mecânica. As duplas ligações que não reagiram podem estar presentes no monômero residual ou pendente nos grupos metacrilatos da rede polimérica. Os monômeros não reagidos podem ser liberados a partir do material polimerizado e irritar os tecidos moles.

Com a proposta de comparar os efeitos de tratamentos térmicos na citotoxicidade de três resinas para bases de próteses Jorge et al.²⁹, em 2004, realizaram um estudo utilizando o teste de incorporação de ³H-timidina e o teste MTT. Para a análise do efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos corpos-de-prova, foram obtidos extratos das

substâncias hidrossolúveis dessas amostras. Para isso, três corpos-de-prova de cada grupo experimental, após terem recebido os tratamentos térmicos, foram colocados dentro de tubos de ensaio com 9 ml de meio de cultura Eagle e incubados a 37°C por 24 horas. Durante esse período de incubação, as substâncias provavelmente tóxicas são difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos a serem utilizados nos testes de citotoxicidade. Um tubo de ensaio contendo apenas 9 ml de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo. Os resultados desse estudo mostraram que as substâncias liberadas das três resinas testadas foram mais citotóxicas para as células L 929 quando comparadas ao controle negativo no teste de incorporação de ³H-timidina. Os tratamentos térmicos não reduziram a citotoxicidade dos materiais avaliados. O teste de incorporação ³H-timidina classificou os materiais como discretamente citotóxicos, e o MTT, como não citotóxicos sendo, portanto, considerado menos sensível.

Campanha et al.¹², em 2006, avaliaram a influência do tratamento pós-polimerização em banho de água e irradiação por microondas sobre a citotoxicidade de seis resinas acrílicas reembasadoras rígidas. Os materiais testados foram Tokuso Rebase Fast (TR), UFI Gel Hard (UGH), Duraliner II (D), Kooliner (K), New Truliner (NT), Light Liner(LL). As amostras da resina LL foram adicionalmente testadas revestidas por uma barreira de ar (LLABC). Para realização do

estudo nove corpos-de-prova em forma de discos de cada material (10 x 1 mm) foram confeccionados e divididos em 3 grupos: grupo 1 (sem tratamento pós-polimerização), grupo 2 (tratamento pós-polimerização em forno de microondas), grupo 3 (Tratamento pós-polimerização em banho de água 55°C por 10 minutos). Após a realização dos tratamentos as amostras foram esterilizadas. As células L929 foram cultivadas em placas de 96 wells em meio de cultura Eagle e incubadas por 24 horas. Os extratos foram obtidos a partir da colocação dos discos confeccionados em tubos de ensaio contendo 9 ml de meio de cultura Eagle e incubado a 37°C por 24 horas. Para servir como controle negativo um tubo de ensaio contendo meio de cultura foi incubado nas mesmas condições. Para avaliar a citotoxicidade foram realizados os testes do MTT e da incorporação do radioisótopo ³H-Timidina. Os resultados mostraram que para o teste do MTT os tratamentos térmicos pós-polimerização não promoveram efeito sobre a citotoxicidade dos materiais avaliados. Quanto ao teste do ³H-timidina, os tratamentos térmicos pós-polimerização reduziram significativamente a citotoxicidade da UGH. A citotoxicidade das resinas K, NT, LL, e LLABC aumentaram após a irradiação microondas. TR, NT e LLABC mostraram um aumento na citotoxicidade após o banho de água. Assim os autores concluíram que quando os materiais foram avaliados pelo teste MTT, a citotoxicidade dos materiais pós-polimerização não foi afetada pelos tratamentos, por outro lado, a análise do ³H-Timidina demonstrou melhora para a resina UGH após os

tratamentos pós-polimerização, entretanto as demais resinas não apresentaram redução da citotoxicidade.

Dhir et al.¹⁵, 2007, avaliou as propriedades físicas (resistência flexural, módulos, sorção de água, solubilidade, coeficiente de difusão, estabilidade de cor e coloração) de duas resinas experimentais (E-10 e E-20) para base de prótese com a adição de concentrações diferentes de fosfato e comparou com a resina Lucitone 199 (controle). Os resultados revelaram que houve um declínio em todas as propriedades com a adição da fosfatase, porém, a resistência flexural e módulo, a sorção água e a solubilidade da resina E-10, assim como para o controle, ficaram dentro das especificações da ADA. Os coeficientes de difusão foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) para os três grupos. A Coloração e a estabilidade de cor dos corpos-de-prova não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os três grupos. Para os autores a diminuição da resistência flexural e os módulos podem estar associados com a diluição de outros componentes do líquido, tais como o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA). Durante o processo de polimerização, o monômero penetra no polímero e o dissolve parcialmente. Após a polimerização, um novo polímero com maior peso molecular é formado, e os agentes de ligação cruzada ajudam nesse processo. O EGDMA é quimicamente e estruturalmente semelhante ao MMA e pode ser incorporado na cadeia, facilitando a interligação das duas cadeias

adjacentes. Isto assegura uma maior interligação das cadeias poliméricas e aumenta a resistência e rigidez da resina.

Merdad et al.⁴⁵, em 2007, avaliou a citotoxicidade dos sistemas obturadores Epiphany Resin-Percha e comparou com a guta-percha e AH-Plus sealer sobre as células HeLa. Estes materiais que foram colocados sobre filtros Milipore em contato direto ou indireto com as células HeLa. Neste experimento os autores sugeriram que o monômero não polimerizado na camada de inibição de oxigênio pode se formar na superfície da resina durante a polimerização, e influenciar significativamente nas propriedades biológicas da resina e implicando no aumento da toxicidade.

As altas concentrações de monômero residual podem afetar as propriedades físicas e mecânicas das resinas, e ainda está associado à toxicidade destes materiais. Assim, Almeida², em 2008, realizou um estudo para quantificar a presença de monômero residual de resinas acrílicas para reembasamento de prótese utilizando o método de cromatografia líquida. Foram avaliadas as resinas Tokuyama Rebase Fast II (TKY) e três resinas experimentais (RE1, RE2, RE3). Os corpos de prova foram confeccionados na dimensão de 50 mm x 2 mm seguindo as instruções dos fabricantes para manipulação e proporção pó/líquido. Após a polimerização, os corpos de prova foram raspados e fragmentados e estas amostras foram pesadas para obtenção de três amostras com 100 mg cada. Então as amostras foram misturadas a um solvente e foram

analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. As maiores concentrações foram observadas nas resinas experimentais: RE1 – 150 a 500 µg/mL, RE2 – 100 a 300 µg/mL, RE3 – 120 a 500 µg/mL. Para a TKY a concentração foi de 70 a 110 µg/mL. Ainda para a TKY foi realizada uma análise da quantidade de monômero não polimerizado liberado *in vitro* em saliva artificial. Assim, os corpos de prova foram imersos em saliva artificial e mantidos em estufa a 37° C. Este conjunto foi armazenado por 1h, 3h, 5h, 24h, 3 dias, 7 dias, 14 dias e 30dias e após estes períodos foram coletadas alíquotas desta solução e colocadas ao sistema cromatográfico para identificação e quantificação. Foram encontradas as concentrações de 5 a 64 µg/mL, sendo que foi observada maior liberação dos monômeros residuais nas primeiras 24 horas e após uma semana não se observou mais a liberação do monômero. De acordo com o estudo a redução do monômero não polimerizado, das resinas acrílicas autopolimerizáveis para reembasamento está diretamente relacionada à própria composição do material.

Gonçalves et al.¹⁷, em 2008, avaliaram a citotoxicidade de duas resinas acrílicas autopolimerizáveis usadas na ortodontia com tempos diferentes de exposição, em três diferentes linhagens de células. Foram confeccionados corpos-de-prova na dimensão de 10 mm x 10 mm x 2 mm a partir das resinas Orto Class e Jet. Os extratos foram obtidos colocando-se quatro corpo-de-prova em cada tubo de ensaio com 9 ml de meio DMEM suplementado com antibiótico e incubado por 24 ou 48 horas

a 37°C. As células utilizadas foram NIH3T3 (fibroblastos de rato), Hep2 (células epiteliais de carcinoma de laringe humana), e HeLa (células epiteliais de carcinoma cervical humano). As células foram cultivadas em placas de 96 wells na concentração de 5×10^4 DMEM suplementado e incubadas por 24 horas a 37°C. Depois deste período as células foram expostas aos extratos por 24 ou 48 horas. Células não expostas aos extratos serviram como controle. Em seguida a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT. Os resultados mostraram que a viabilidade dos fibroblastos não foi afetada quando as células foram expostas aos extratos obtidos em 24 horas, e apresentaram maior viabilidade que o controle quando expostas aos extratos de 48 horas. Quando as células epiteliais foram expostas aos extratos de 24 horas, apresentaram efeito citotóxico para as duas resinas, o mesmo não foi observado quando essas células foram expostas ao extrato obtido por 48 horas. Assim, os autores concluíram que a imersão por longos períodos diminuiu o efeito citotóxico para os materiais testados.

Urban et al.⁶⁷, em 2009, avaliou o efeito do banho de água pós-polimerização a 55 ° C durante 10 min (BM) no conteúdo e na liberação de monômero residual, grau de conversão, resistência flexural e dureza de quatro resinas reembasadoras Kooliner e New Truliner (monômeros monofuncionais), UFI Gel hard e Tokuso Rebase Fast (monômeros bifuncionais). Para avaliar a liberação e o conteúdo do monômero residual foram confeccionados 12 amostras de cada material em forma de

disco, com dimensão de 50mm de diâmetro e 2mm de espessura, estas foram armazenadas em saliva artificial a 37 ± 1 °C. O monômero residual e os plastificante foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O grau de conversão das resinas foi avaliado utilizando espectroscopia FT-Raman. Para esta análise 10 amostras de cada material foram confeccionados na dimensão de 10mm x 4mm x 4mm. Para a análise da resistência flexural foram confeccionados 20 amostras de cada material, na dimensão de 64mm x 10mm x 3.3mm). As amostras foram submetidas ao teste de flexão em uma máquina universal de testes com carga de 3 pontos e velocidade de 5mm/min até a fratura da amostra. Após o teste de resistência flexural um fragmento de cada amostra foi selecionado para o teste de microdureza, sendo submetido ao teste de microdureza Vickers. Os resultados mostraram que o banho de água produziu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na quantidade de monômero residual na primeira hora de imersão. Exceto para a resina Ufi Gel hard, o banho de água diminuiu o tempo de liberação dos componentes residuais avaliados. Todos os materiais avaliados apresentaram significativamente ($p < 0,050$) menores valores de monômero residual e plastificante após o banho de água, em relação ao grupo controle. O banho de água aumentou o grau de conversão das resinas Kooliner e Tokuso Rebase Fast e a dureza das resinas New Truliner, Kooliner e Tokuso Rebase Fast ($p < 0,050$). Somente a resina Kooline mostrou aumento na resistência a flexão após o banho de água (p

<0,050). As resinas Kooliner e New Truliner apresentam monômeros monofuncionais ao passo que as resinas Ufi Gel Hard e Tokuso Rebase Fast utilizam os monômeros bifuncionais. A presença do monômero bifuncional pode melhorar o processo de polimerização, através da disponibilização de mais grupos reativos de radicais livres para a polimerização. Além disso, o agente de ligação cruzada 1,6-HDMA presente na Kooliner e Tokuso Rebase Fast apresenta uma grande distância entre os dois grupos metacrilato, o que poderia aumentar a reatividade dos grupo metacrilatos. Clinicamente a imersão de próteses reembasadas em água a 55 ° C durante 10 minutos poderia reduzir a quantidade e o tempo de liberação de componentes residuais e melhorar as propriedades mecânicas de alguns dos materiais avaliados.

Proposição

3 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de dois reembasadores experimentais rígidos com alta porcentagem de agentes de ligação cruzada comparativamente a uma resina comercial, por meio da incorporação de ^3H -Timidina e do teste do MTT.

Material e Método

4 Material e Método

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais, instrumentos e aparelhos utilizados para confecção dos corpos-de-prova

- balança de precisão Gehaka, Ind. e Com. Eletro – Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo – Brasil
- matriz metálica vazada com orifício de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura
- placas de vidro
- folhas de acetato
- espátula metálica nº 24
- potes dappens
- resina acrílica para reembasamento de prótese Tokuyama Rebase II, Tokuyama Dental Corporation – Japão*
- resinas acrílicas experimentais para reembasamento (R1 e R2)*, desenvolvidas em parceria entre a Disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP e a VIPI Ind.com.Exp. e Imp. Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga – SP - Brasil.

* A composição das resinas reembasadoras utilizadas neste estudo são apresentadas no Quadro 1.

4.1.2 Aparelhos utilizados para esterilização dos corpos-de-prova

- aparelho de ultra-som, Ultrasonic Cleaner 1440D, Odontobrás, Ribeirão Preto – SP - Brasil
- capela de fluxo laminar, Veco do Brasil, Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Campinas – SP - Brasil

4.1.3 Materiais, instrumentos e aparelhos utilizados para obtenção dos extratos, cultura, manutenção e quantificação das células e testes de citotoxicidade.

- aparelho Filtermate Harvester, Unifilter 96 GF/C – Packard Instrument Company, Meriden – CT - USA
- câmara hemocitométrica tipo Neubauer, Boeco, Hamburg - Alemanha
- capela de fluxo laminar, Veco do Brasil, Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Campinas – SP - Brasil
- centrífuga especial com suspensão auto balanceável, Fanem Ltda, São Paulo – SP - Brasil
- contador de cintilação, Packard Instrument Company, Meriden – CT - USA

- corante azul de Tripán, Merck - Indústrias Químicas Rio de Janeiro – RJ – Brasil
- estufa para cultura de células, Forma Scientific, Marietta – OH - USA
- fibroblastos L929, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP – Brasil
- frascos para cultura de células, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA
- líquido de cintilação Microscint 20, Packard Instrument Company, Meriden – CT - USA
- meio de cultura Eagle, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP – Brasil
- microscópio óptico, Nikon – modelo YS 100, Tokyo - Japão
- pipetas graduadas de 10 ml, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA
- pipetas graduadas de 5 ml, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA
- pipetador automático, Boeco, Hamburg - Alemanha
- ponteiros azuis para pipetas automáticas de 101-1000µl, Axygen Scientific, California - USA
- ponteiros amarelos para pipetas automáticas de 20-200µl, Axygen Scientific, California - USA
- placa para cultura de células com 96 orifícios, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA

- placas para contador de cintilação com 96 compartimentos, Packard Instrument Company, Meriden – CT – USA
- radioisótopo ^3H -timidina, Amersham Pharmacia Biotech do Brasil Ltda, São Paulo – SP - Brasil
- soro fetal bovino, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP - Brasil
- sulfato de gentamicina, Indústria Química e Farmacêutica, Schering – Plough S/A, Rio de Janeiro - RJ - Brasil
- tubos de ensaio, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA
- tripsina - Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP – Brasil
- Sal do MTT, UBS Sigma Chemical Co., St Louis – MO – USA
- Álcool isopropílico, Quimex, São Paulo – SP – Brasil

4.2 Métodos

4.2.1 Confecção dos corpos-de-prova

Os corpos-de-prova foram confeccionados dentro de condições assépticas para evitar a contaminação do meio de cultura. Dessa forma, um único operador, atuando sobre uma superfície de papel estéril, confeccionou os corpos-de-prova utilizando instrumental esterilizado, jaleco, luvas, gorro, e máscaras descartáveis e óculos de proteção. Assim, os corpos-de-prova das resinas foram confeccionados a partir de matrizes metálicas vazadas (Figura 1), contendo no seu interior um orifício

medindo 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (Figura 2).

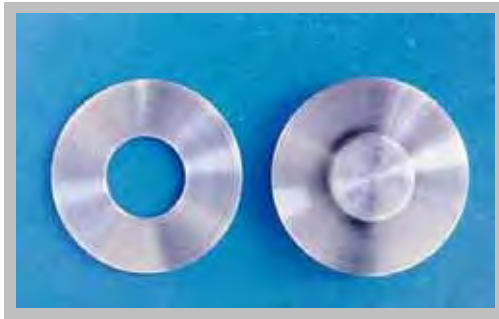


FIGURA 1 – Matriz Metálica e êmbolo.



FIGURA 2 – Dimensão do corpo-de-prova.

O Quadro 1 apresenta a composição e a proporção dos materiais utilizados neste estudo. O pó foi proporcionado em balança de precisão utilizando frascos Dappen esterilizados, os quais foram individualizados para cada material. O volume de monômero foi dispensado com o auxílio de pipetas de vidro graduadas, tomando-se cuidado de se usar pipetas diferentes para cada material, tendo em vista que a citotoxicidade das resinas acrílicas está relacionada com cada tipo de monômero. Após a mistura, as resinas foram inseridas nas matrizes vazadas e prensadas manualmente entre duas placas de vidro esterilizadas interposta com duas folhas de acetato, também esterilizadas, até o término da polimerização (Figura 3). Para a remoção das amostras, o êmbolo foi posicionado na matriz de forma a deslocar o corpo-de-prova, sendo o excesso do material recortado com tesoura esterilizada. Para cada teste de citotoxicidade, foram destinados três corpos-de-prova de cada material (Figura 4).

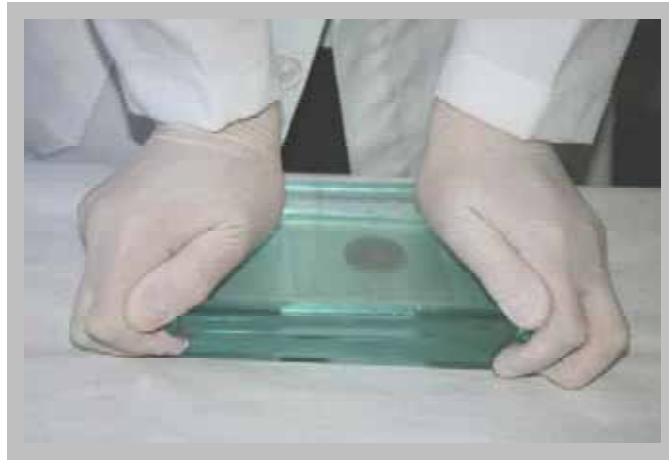


FIGURA 3 – Prensagem manual da resina.



FIGURA 4 – Corpos-de-prova dos materiais avaliados.

Quadro 1- Materiais utilizados

Reembasadores (códigos)	Composição		Proporção pó/líquido
	Pó	Líquido	
R1	PEMA	50% 1,4-Butanediol Dimetacrilato (BDMA) 47,2% Etileno glicol Dimetacrilato (EDGMA)	2,1 g 1,6 ml
R2	PEMA	77,2% 1,4-Butanediol Dimetacrilato (BDMA) 20% Etileno glicol Dimetacrilato (EDGMA)	2,1 g 1,6 ml
Tokuyama Rebase Fast II (TRF)	PEMA	59% 2-Acetoacetoxi Etil Metacrilato (AAEM) 39% 1,9-Nonanediol Dimetacrilato (NDMA)	2,4 g 1,0 ml

4.2.2 Esterilização dos corpos-de-prova

Anteriormente a colocação dos corpos-de-prova no meio de cultura, para a obtenção dos extratos, os corpos-de-prova foram colocados em invólucros plásticos estéreis hermeticamente fechados e receberam banho de ultra-som por 20 minutos. Em seguida, ficaram expostos à luz ultravioleta na capela de fluxo laminar (Figura 5) por mais 20 minutos para cada lado do corpo-de-prova com o objetivo de eliminar os possíveis microorganismos remanescentes⁵⁶.



FIGURA 5 – Capela de Fluxo.

4.2.3 Obtenção dos extratos

Para a análise do efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos corpos-de-prova, foram obtidos extratos das substâncias hidrossolúveis dessas amostras.^{74,37,25,55,56,28} Para isso, três corpos-de-prova de cada material, foram colocados dentro de tubos de ensaio com 9 ml de meio de cultura Eagle, destinados para cada material, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µl /ml de gentamicina, e incubados a 37°C por 24 horas (Figura 6). Durante esse período de incubação, as substâncias provavelmente tóxicas foram difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos utilizados no teste de citotoxicidade. Um tubo de ensaio contendo apenas 9 ml de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo.



FIGURA 6 – Obtenção dos extratos.

4.2.4 Cultura e manutenção das células

O possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelas resinas foi avaliado pelo método de cultura de células. Dessa forma, fibroblastos L929^{25,14} foram propagados em meio de cultura de Eagle suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/ml de gentamicina. O cultivo das células foi realizado em frascos para culturas de células (Figura 7). Esses frascos ficaram incubados em estufa para cultura de células com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C e ambiente com umidade controlada (Figura 8).



FIGURA 7 – Frasco para cultura de células.



FIGURA 8 – Estufa para armazenamento de células.

Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novos frascos após períodos de 3 dias de incubação, até que se procedesse o teste de citotoxicidade. Para isso, foi colocado 1 ml de tripsina com a finalidade de desagregar as células da parede do fundo do frasco e obter uma suspensão. Dessa suspensão de células, cada 1 ml foi colocado em novo frasco, sendo acrescentados 9 ml de meio de cultura suplementado, com o auxílio de uma pipeta graduada e um pipetador

automático (Figura 9). Cada frasco foi, então, tampado e levado à estufa para a formação de nova confluência de células.



FIGURA 9 – Manutenção celular.

É importante salientar que todos os procedimentos foram realizados em área asséptica dentro da capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70%. Além disso, os materiais utilizados, com exceção das células, foram esterilizados previamente em luz ultravioleta durante 20 minutos dentro da capela de fluxo laminar.

4.2.4 Quantificação das células

Para a realização dos testes de citotoxicidade, uma suspensão de $1,0 \times 10^5$ células/ml de meio de cultura foi preparada. Para isso, as células foram descoladas do fundo da garrafa colocando-se tripsina. Em seguida, essa suspensão foi colocada em um tubo de 15 ml e levada para

uma centrífuga especial autobalanceável, por 10 minutos a 1.500 rpm, com o objetivo de precipitar as células no fundo do tubo (Figura 10). Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1 ml de meio de cultura Eagle, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/ml de gentamicina, foi acrescentado e as células misturadas a ele. A partir daí, 10 µl foram retirados e adicionados a 90 µl de corante azul de Tripán. Dessa solução, 10 µl foi removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico com aumento de 40x (Figura 11). Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de $1,0 \times 10^5$ células/ml de meio de cultura para posterior utilização no teste de citotoxicidade, variando-se apenas o volume da suspensão.



FIGURA 10 – Centrífuga.



FIGURA 11 – Microscópio óptico.

4.2.5 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade dos materiais foi analisada quantitativamente por meio da incorporação do radioisótopo ^3H – Timidina, e pela análise colorimétrica do MTT

4.2.5.1 Análise quantitativa por meio da incorporação do radioisótopo ^3H – Timidina.

Para a realização do teste, 100 μl da suspensão contendo $1,0 \times 10^5$ células/ml, ou seja, $1,0 \times 10^4$ células/well, foram colocados em cada orifício de fundo plano de uma placa com 96 orifícios e incubada em estufa com 5% de CO_2 , a 37°C por 24 horas. Após este período, o meio de cultura que nutria as células foi descartado e 20 μl de meio de cultura Eagle contendo 0,25 μCi de ^3H – Timidina (Figura 12) foi inserido em cada orifício da placa juntamente com 50 μl de meio de cultura novo e 50 μl do extrato contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova e incubada por 24 horas em estufa com 5% de CO_2 à temperatura de 37°C . Para cada grupo experimental, foram destinados três orifícios da placa. Três orifícios da placa contendo as células aderidas receberam apenas a solução de timidina e 100 μl de meio de cultura Eagle novo, servindo, dessa forma, como grupo controle negativo. Após o período de 24 horas em contato com os extratos, foi colocado em cada orifício da placa 50 μl de tripsina, sendo esta armazenada por 5 minutos na estufa a 37°C para que as células se desprendessem do fundo do compartimento e ficassem

em suspensão. Em seguida, a placa foi levada para o aparelho Filtermate Harvester (Figura 13) onde o sobrenadante foi desprezado e as células marcadas com material radioativo foram aspiradas, ficando presas em filtros de outra placa de 96 orifícios (Figura 14). Após um período de 24 horas, a placa foi vedada com um selador opaco na sua parte inferior e, então, 30 µl de líquido de cintilação (Microscint 20) foram colocados em cada orifício. Posteriormente, um selador transparente foi colocado na parte superior da placa, levada para análise da síntese de DNA em um contador de cintilação. Através da vibração do líquido de cintilação, a qual ocorre devido à síntese de DNA, é que o contador de cintilação realizou a leitura do número de células em proliferação em cintilações por minuto (cpm)(Figura 15).



FIGURA 12 – Radioisótopo ^3H - Timidina.



FIGURA 13 - Filtermate Harvester.

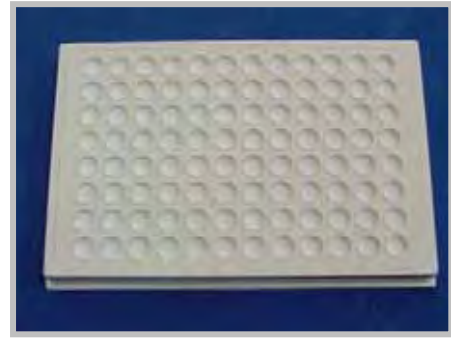


FIGURA 14 – Placa de 96 orifícios.



FIGURA 15 – Contador de cintilação.

4.2.5.2 Análise quantitativa MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolium bromido).

Por esta técnica, o sal metiltetrazolium foi incorporado à cultura de células. A enzima desidrogenase succínica das células vivas quebra a estrutura do sal tetrazolium, produzindo cristais de formazan cor azul, determinando, dessa forma, valores relativos à intensidade da cor azul em

espectrofotômetro específico com comprimento de onda determinado. Quanto maior a atividade mitocondrial, maior será a intensidade da cor azul e, assim, maior o número de células vivas. Para a realização do teste, 100 µl da suspensão composta de $1,0 \times 10^5$ células/ml, ou seja, $1,0 \times 10^4$ células/well foram colocados em cada orifício de fundo plano de uma placa com 96 orifícios, incubada em estufa com 5% de CO₂, a 37°C por 24 horas. Após esse período de incubação, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa, e 50 µl de meio de cultura novo foram colocados em cada orifício da placa juntamente com 50 µl do extrato contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova, a qual foi incubada por 24 horas em estufa com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C. Para cada grupo experimental, foram destinados três orifícios da placa (análise em triplicata). Três compartimentos da placa não receberam o extrato das substâncias liberadas e receberam apenas 100 µl de meio de cultura novo suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/ml de gentamicina (grupo controle negativo). Após o período de incubação de 24 horas, foi preparado em um tubo, revestido exteriormente com papel alumínio, uma solução de MTT. Para isso foram utilizados 10 mg do sal do MTT, 2 ml de PBS e 8 ml de meio de cultura puro (sem a presença de soro fetal bovino e antibiótico), que então foi agitada até a homogeneização da solução (Figura 16). Em seguida, 100 µl dessa solução foram adicionados a cada compartimento da placa destinado aos grupos experimentais e controle, a

qual permaneceu incubada por um período de 3 horas a 37°C para a formação dos cristais de formazan, decorrentes da atividade mitocondrial. Após este período, 100 µl de álcool isopropílico foram adicionados a cada compartimento da placa. Posteriormente, a placa foi levada ao aparelho espectrofotômetro Multiscan para ser levemente agitada para a dissolução dos cristais de formazan e em seguida a análise da atividade mitocondrial foi realizada pelo próprio aparelho com comprimento de onda de 540 nm. A absorbância óptica também foi medida em comprimento de onda de 620 nm (Figura 17). Os valores de cada comprimento de onda foram subtraídos e, assim, o resultado final da atividade mitocondrial foi obtido.

Para os dois testes descritos acima os experimentos foram realizados em triplicata, ou seja, para cada teste realizado foram destinados três orifícios da placa de 96 orifícios para cada material testado, e também foram realizados em três repetições, ou seja, cada teste foi realizado três vezes, iniciados em três diferentes dias, aumentando assim a confiabilidade dos resultados obtidos.



FIGURA 16 - Elementos para preparação da solução do MTT.



FIGURA 17 - Espectofotômetro Multiscan.

4.2.6 Metodologia Estatística

Os resultados da síntese de DNA obtidos a partir da incorporação do radioisótopo ^3H -Timidina, bem como os resultados do metabolismo mitocondrial (teste do MTT) das células viáveis após o contato com os extratos dos materiais estudados, foram submetidos à análise de variância de um fator: material reembasador. Obtendo-se

assim três grupos experimentais que foram comparados com um grupo controle negativo, ao qual se supõe corresponder o índice de citotoxicidade mínima quando comparado com o da citotoxicidade dos outros grupos. Assim, foi adotado o nível de significância de 5% para a tomada de decisão.

A validade da análise de variância depende, principalmente, da homogeneidade de variâncias e da normalidade dos resíduos. A homogeneidade de variância se refere à igualdade das variâncias nos diversos grupos experimentais, incluindo o controle, enquanto que os resíduos são determinados pela diferença entre os valores experimentais e a média dos grupos a que pertencem. A homogeneidade de variância foi testada pelo teste de Levene e a normalidade de resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk.

Após a avaliação estatística, comparando-se com o controle os resultados da incorporação de ^3H -Timidina e os resultados obtidos pelo teste do MTT, os materiais foram classificados de acordo com o efeito citotóxico em: **não citotóxico** – inibição do crescimento celular menor que 25% em relação ao grupo controle, **discretamente citotóxico** - inibição do crescimento celular entre 25% a 50% em relação ao grupo controle, **moderadamente citotóxico** - inibição do crescimento celular entre 50% a 75% em relação ao grupo controle, **severamente citotóxico** - inibição do crescimento celular maior que 75% em relação ao grupo controle^{25,51,14}.

Resultado

5 Resultado

5.1 Análise quantitativa por meio da incorporação de ³H-Timidina

Na Tabela 1 são dadas as médias e desvios padrão de porcentagens de viabilidade celular dos reembasadores em estudo obtidas pelo método da incorporação do ³H-Timidina. A análise de variância não identificou diferenças significativas entre as médias ao nível de 5% ($p= 0,107$). Uma interpretação do resultado pode ser obtida pela Figura 18, onde estão representadas as médias, juntamente com intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais. Quanto maior a sobreposição dos intervalos, menor a evidência de diferença entre as médias. Adotou-se o como controle 100% para o teste do ³H-Timidina.

Considerando-se a equivalência entre as viabilidades celulares dos três reembasadores, apontada pela análise de variância, e levando-se em conta a norma da ISO 10993-5, observa-se que as médias de viabilidade celular dos materiais podem ser consideradas moderadamente citotóxicas.

Tabela 1 - Médias e desvios padrão de porcentagem de viabilidade celular determinadas pelo método da incorporação do ^3H -Timidina

Reembasador	Média	Desvio padrão
T	33,40	8,03
R1	43,35	4,58
R2	31,01	6,49

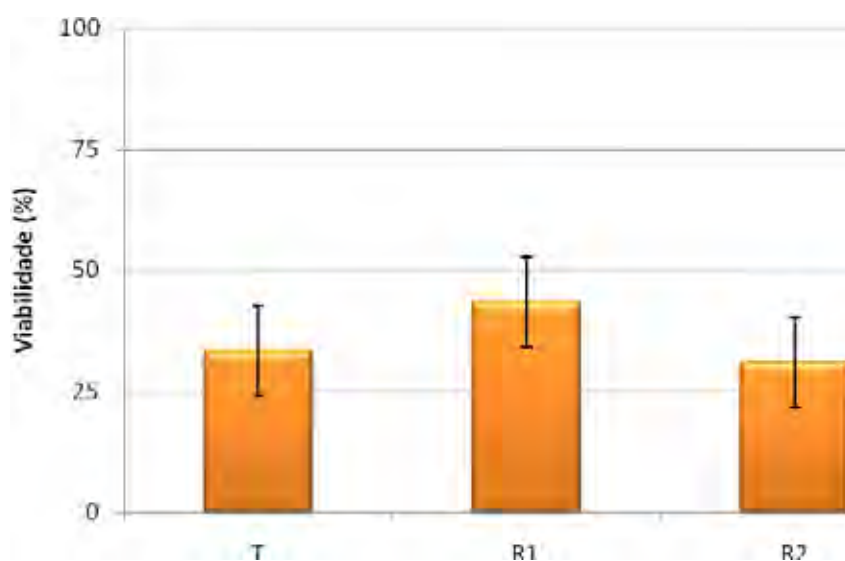


FIGURA 18 - Médias amostrais (colunas) de porcentagem de viabilidade celular e respectivos intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) de acordo com o reembasador obtidas pelo método da incorporação do ^3H -Timidina.

Na Tabela 2 encontram-se as médias e desvios padrão de porcentagens de viabilidade celular dos reembasadores em estudo obtidas pelo método MTT. A análise de variância não evidenciou diferenças significativas entre as médias ao nível de 5% ($p=0,614$). Na Figura 19 estão representadas as médias e os intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais. Adotou-se o como controle 100% para o teste do MTT.

Novamente há equivalência entre as viabilidades celulares dos três reembasadores, mas as médias de citotoxicidade, de acordo com a norma da ISO 10993-5, se situam no limite entre não-citotóxico e discretamente citotóxico.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão de porcentagem de viabilidade celular determinadas pelo método MTT

Reembasador	Média	Desvio padrão
T	71,98	7,84
R1	71,92	4,83
R2	76,08	6,11

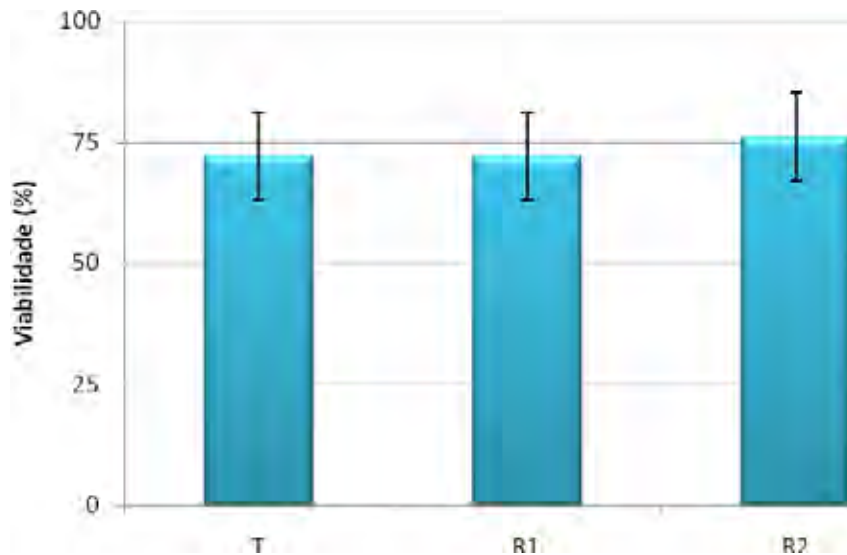


FIGURA 19 - Médias amostrais (colunas) de porcentagem de viabilidade celular e respectivos intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) de acordo com o reembasador obtidas pelo método MTT.

A Figura 20 é um sumário comparativo dos resultados obtidos pela sobreposição dos dois gráficos dos testes realizados (^3H -Timidina e MTT), para a melhor visualização das diferenças entre os resultados de ambos os testes.

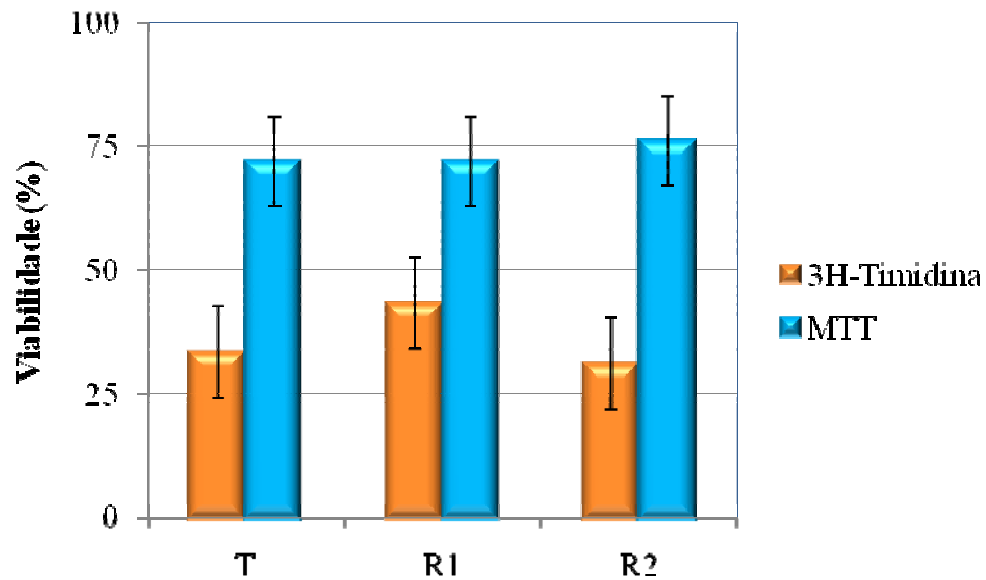


FIGURA 20 – Gráfico comparativo das médias amostrais (colunas) da porcentagem de viabilidade celular e respectivos intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) de acordo com o reembasador obtidas pelos métodos da incorporação do ^3H -Timidina e MTT.

Discussão

6 Discussão

A propriedade biológica dos materiais odontológicos é importante em relação ao seu uso clínico²³. Assim, neste estudo, foi avaliada a biocompatibilidade de duas resinas autopolimerizáveis experimentais (R1 e R2) para reembasamento imediato com alta porcentagem de agentes de ligação cruzada (EGDMA e BDMA). Como parâmetro de comparação, foi utilizada a resina Tokuyama Rebase Fast II (TRF). A resina TRF foi selecionada por também apresentar alta porcentagem de agentes de ligação cruzada e boas características de trabalho. Para a análise da biocompatibilidade, foram utilizados dois diferentes testes em cultura de células L929, para a obtenção de informações mais completas a respeito da citotoxicidade dessas resinas.

Os testes de citotoxicidade são realizados para determinar como uma amostra de material afeta um determinado tipo de célula. Embora os experimentos com células, *in vitro*, não sejam capazes de reproduzir as condições *in vivo*, eles são muito utilizados por apresentarem métodos simplificados de investigação da citotoxicidade e limitarem o número de variáveis experimentais⁵⁶.

Os testes selecionados para a avaliação das resinas reembasadoras foram a incorporação do radioisótopo ³H-Timidina, que avalia a síntese de DNA^{61, 73,24}, e o teste do MTT (sal de metil tetrazolium), o qual reflete o metabolismo celular por meio da atividade

mitocondrial^{46,14,17}. No teste do ³H-timidina, a incorporação do radioisótopo ao material genético ocorre apenas nas células que estão em proliferação, detectadas por meio do contador de cintilação. No teste colorimétrico do MTT, a desidrogenase succínica mitocondrial das células vivas quebra a estrutura do sal de metil tetrazolium, gerando os cristais de formazan azul, e a intensidade da cor azul é medida pelo espectrofotômetro^{46,73,14,47}. A quantidade de cristais de formazan formados é diretamente proporcional ao número de células vivas, utilizando-se população homogênea de células, o que permite a mensuração da atividade celular mesmo na ausência de proliferação. Consequentemente, quanto mais cristais de formazan são formados, mais intensa é a cor azul, indicando o grau de citotoxicidade⁴⁶. Ambos os testes permitem a avaliação da citotoxicidade quando as células estão em contato com as substâncias tóxicas liberadas pelo material avaliado, em comparação com o grupo controle.

As variações na composição química, a pureza das resinas disponíveis comercialmente, o grau de conversão do monômero, a estrutura química dos monômeros e as variações na manipulação podem afetar as propriedades físicas e biológicas das resinas acrílicas³⁶. Pesquisadores têm estudado recursos para minimizar a presença do monômero residual, entre eles alterações na composição química das resinas. Com essa finalidade, tem-se procurado monômeros que sejam altamente reativos, dando-se maior atenção aos monômeros conhecidos

como agentes de ligação cruzada, metacrilatos bifuncionais ou dimetacrilatos^{3,75,2}. De acordo com a literatura, não somente a presença dos agentes de ligação cruzada interfere nas propriedades dos materiais, como também a proporção deles no líquido do monômero. Altas concentrações de agentes de ligação cruzada aumentam o processo de polimerização, minimizam a quantidade de monômero residual e melhoram as propriedades das resinas^{3,4}. Assim, promovem maior grau de conversão que os monômeros monofuncionais em virtude da longa distância entre os grupos metacrilatos na cadeia polimérica, o que aumenta a reatividade das ligações duplas favorecendo a conversão do monômero em polímero⁵³.

Os resultados deste estudo revelaram que não houve diferença significativa na viabilidade celular entre os materiais experimentais e a TRF em ambos os testes. A quantidade de liberação de substâncias depende do grau de conversão e da composição da resina⁷⁶. Considerando a composição dos materiais, a molécula de EGDMA contém dois grupos metacrilatos, os quais podem ser polimerizados em cadeias separadas, podendo também ligar as duas cadeias poliméricas entre si. Isto assegura maior interligação das cadeias poliméricas¹⁵. O BDMA (extensor de cadeia) forma um grupo de componentes de moléculas simples, e sua cadeia molecular principal dá origem a diferentes conformações, originando tanto moléculas polares como não polares. A distância entre os grupos polares varia de um isômero

posicional para outro, possibilitando ligações internas de hidrogênio com diferentes resistências³⁸.

Nossa expectativa era de que os polímeros contendo os agentes de ligação cruzada BDMA e EGDMA mostrassem maior biocompatibilidade. A razão para isso é que a presença desses agentes de ligação cruzada poderia melhorar o processo de polimerização pela disponibilização de mais grupos reativos de radicais livres para a polimerização⁶⁸. Além disso, o aumento de agentes de ligação cruzada nas resinas acrílicas reembasadoras reduziria a solubilidade e a sorção água, diminuindo a liberação de monômero residual³. Uma redução no conteúdo de monômero residual é positiva não apenas para a biocompatibilidade, como também para as outras propriedades e a durabilidade do material⁷⁰.

Neste estudo, os materiais foram testados imediatamente após a polimerização; assim, a citotoxicidade encontrada pode ser devida à liberação de monômero não reagido. As resinas reembasadoras foram polimerizadas em temperatura ambiente. Nesta condição, geralmente os dimetacrilatos resultam em uma resina de superfície extremamente lisa (vitrificada), indicando que apenas uma parte das duplas ligações disponíveis reagiu. Somente os monômeros muito flexíveis, em que os grupos reativos do metacrilato são relativamente distantes, podem reagir completamente à temperatura ambiente⁵⁸. O EGDMA e o BDMA proporcionam ligações cruzadas curtas entre as moléculas lineares

adjacentes⁴⁶ (Figura 21). As duplas ligações não reagidas podem estar presentes no monômero livre ou penderes nos grupos da cadeia polimérica. O monômero não reagido pode ser liberado de materiais polimerizados e causar efeitos citotóxicos⁵⁸.

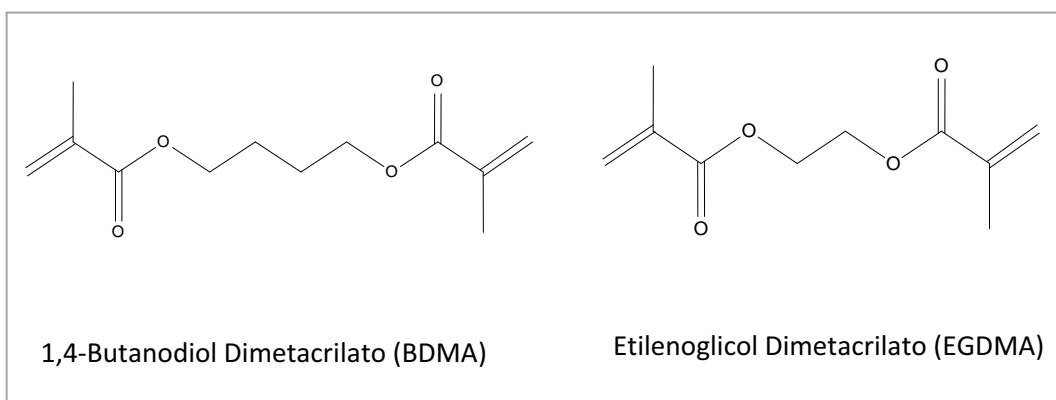


FIGURA 21 – Estrutura química dos monômeros bifuncionais (BDMA e EGDMA).

Outra explicação para os nossos resultados seria a reação de polimerização ser parcialmente inibida pelo oxigênio quando a reatividade do oxigênio com os radicais livres fosse maior que a dos radicais livres com os monômeros, Isso leva à formação de uma camada de resina não polimerizada, que se chama camada de inibição⁷¹. Ela influencia significativamente nas propriedades biológicas das resinas e implica no aumento da toxicidade⁴⁵.

Outro aspecto que deve ser considerado é que os materiais deste estudo foram colocados no meio de cultura imediatamente após a polimerização, permanecendo nessa condição por 24 horas. Assim, o

monômero não reagido provavelmente foi liberado em maior quantidade nesse período. Alguns pesquisadores relataram que a maior quantidade de monômero residual é liberada em água na primeira hora após a polimerização e que, após esse período, a liberação continua de forma mais lenta^{11,8}. Assim, os maiores efeitos dos monômeros ocorrem nessa primeira hora após a polimerização. Isto também poderia ser uma explicação para a toxicidade encontrada.

Outra possível causa da citotoxicidade encontrada neste estudo poderia ser o resultado da liberação de compostos, tais como aditivos, subprodutos da reação de polimerização de radicais livres e produtos de degradação, como bifênolo e fenil benzoato, formaldeído, ácido metacrílico, ácido benzóico, fenilo salicilato^{53, 33, 62,63,41}. Portanto, futuros estudos devem ser realizados para identificar os componentes individuais do extrato que foram responsáveis pela citotoxicidade observada.

Os resultados deste estudo revelaram que, no teste de incorporação do ³H-timidina, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os materiais quanto ao grau de citotoxicidade das resinas reembasadoras. Todas as resinas acrílicas foram classificadas como moderadamente citotóxica de acordo com as normas da ISO²⁵ (1992). No teste do MTT, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os materiais

quanto ao grau de citotoxicidade e todas as resinas acrílicas foram classificadas no limite entre não citotóxico e discretamente citotóxico.

A diferença no grau de citotoxicidade encontrado entre os dois testes está diretamente relacionada ao tipo de análise proposto por cada teste. De acordo com Mosmann⁴⁶ (1983), o teste colorimétrico do MTT mede o número e a atividade de células vivas no final do teste, e o teste de incorporação do ³H-Timidina quantifica o número de células que estão realizando síntese de DNA durante as últimas quatro horas do ensaio. O entendimento do mecanismo desses dois testes é importante para a aplicação correta de cada um, por exemplo, para distinguir entre morte, sobrevivência e proliferação celular. Neste estudo, o teste do ³H-Timidina evidenciou que a presença do monômero residual inibiu a proliferação celular na faixa de 50% a 75%. Porém, mesmo ocorrendo uma redução na síntese de DNA, foi observado, por meio do teste do MTT, que a maior parte das células ainda apresentava atividade mitocondrial, ou seja, ainda estavam vivas e realizando respiração celular, e que a presença do monômero inibiu, em média, de 0% a 29% da atividade mitocondrial.

Os resultados deste estudo são concordantes com outros estudos que também constataram diferenças no grau de citotoxicidade quando aplicados os testes de incorporação do ³H-Timidina e do MTT. Para os autores desses trabalhos, o teste do ³H-Timidina foi considerado o mais sensível na detecção da toxicidade de resinas^{61,73, 29,12}.

Um aspecto interessante a ser observado é que, embora a citotoxicidade tenha sido semelhante entre os três materiais, a resina reembasadora experimental R1, no teste do ^3H -Timidina, mostrou uma tendência de resposta menos citotóxica e uma melhor padronização na obtenção dos dados durante as repetições dos testes em laboratório. Uma explicação para isso estaria relacionada à proporção de agentes de ligação cruzadas utilizada na composição desse material.

Os resultados obtidos demonstraram que a TRF teve grau de citotoxicidade semelhante aos da R1 e da R2. A TRF contém uma elevada porcentagem de agente de ligação cruzada (39% de 1,9-nonanediol dimetacrilato). O uso de metacrilato bifuncional apresenta vantagens que incluem menor contração e maior resistência, e esse produto ainda é considerado menos tóxico que os monômeros monofuncionais em consequência da menor volatilidade e por apresentar menor difusão nos tecidos biológicos⁵⁸. Os monômeros bifuncionais ainda possibilitam um maior grau de conversão em comparação com os monômeros monofuncionais, uma vez que os agentes de ligação cruzada bifuncionais proporcionam um aumento do entrecruzamento dos oligômeros formados por causa da dupla ligação C=C terminal nas extremidades da molécula². O resultado é o aumento da polimerização e a diminuição do monômero não-reagido, decorrentes da disponibilização de mais grupos reativos de radicais livres na polimerização^{3,58}. A estrutura

química do monômero está diretamente relacionada ao grau de conversão⁵⁸ e à citotoxicidade da resina⁷⁶.

Do ponto de vista clínico, a aplicação direta na cavidade bucal dos materiais reembasadores experimentais provavelmente não causariam irritação aos tecidos, uma vez que eles apresentaram comportamento similar ao Tokuyama Rebase Fast II, produto encontrado comercialmente. Além disso, sabe-se que a fibromucosa é geralmente mais resistente às substâncias tóxicas do que uma cultura celular, pela presença de mucina e pela camada de queratina¹⁷. Portanto, testes *in situ* e *in vivo* ainda são recomendados.

Conclusão

7 Conclusão

Diante das condições experimentais deste estudo e da metodologia empregada, podemos concluir que:

- 1- Não houve diferença na viabilidade celular em ambos os testes para todos os materiais avaliados.
- 2- Todos os materiais avaliados foram classificados como moderadamente citotóxico pelo teste de incorporação do ^3H -Timidina.
- 3- No teste do MTT todos os materiais avaliados foram classificados entre não citotóxico e discretamente citotóxico.

Referências

8 Referências*

1. Al Doori D, Huggett R, Bates JF. A comparison of denture base acrylic polymerized by microwave irradiation and by convention water bath curing system. *Dent Mater.* 1988; 4: 25-32.
2. Almeida FG. Quantificação de metacrilatos residuais e avaliação da liberação em saliva artificial, a partir de resinas acrílicas para reembasamento imediato [dissertação de mestrado]. São Carlos: Centro de Ciências e Tecnologia da UFSCar; 2008.
3. Arima T, Murata H, Hamada T. Properties of highly cross-linked autopolymerizing relined acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1995; 73: 55-9.
4. Arima T, Murata H, Hamada T. The effects of cross-linking agents on the water sorption and solubility characteristics of denture base resin. *J Oral Rehabil.* 1996; 23: 476-80.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: [HTTP://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

5. Barron DJ, Schuster GS, Caughman GB, Lefebvre CA. Biocompatibility of visible light-polymerized denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1993; 6:495-501.
6. Bartoloni JA, Murchison DF, Wofford DT, Sarkar NK. Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques. *J Oral Rehabil.* 2000; 27: 488–93.
7. Bayraktar G, Guvener B, Bural C, Uresin Y. Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage in water on the residual methyl methacrylate content in dental acrylic resins. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;76:340-5.
8. Bettencourt A, Calado A, Amaral J, Vale FM, Rico JM, Monteiro J, Lopes A, Pereira L, Castro M. In vitro release studies of methylmethacrylate liberation from acrylic cement powder. *Int J Pharm.* 2000; 197:161-8.
9. Bohnenkamp DM. Traumatic stomatitis following an intraoral denture relines: a clinical report. *J Prosthet Dent.* 1996; 76: 113-4.
10. Brauer GM, Stansbury JW. Intermediate restoratives from n-hexyl vanillate-EBA-ZnO-glass composites. *J Dent Res.* 1984; 63:1315-20.
11. Brauer GM, Lee CH. Oligomers with pendant isocyanate groups as tissue adhesives. I. Synthesis and characterization. *Biomed Mater Res.* 1989; 23:295-309.

12. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of hard chair-side relines resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont.* 2006; 19: 195-201.
13. Cormack PAG, Elorza AZ. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2004; 804:173–82.
14. Costa CAS. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela C. *Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia.* São Paulo, Artes Médicas; 2001. p.145-60.
15. Dhir G, Berzins DW, Dhuru VB, Periathamby AR, Dentino A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. *J Prosthodont.* 2007;16:465-72.
16. Dogan A, Bek B, Cevik NN, Usanmaz A. The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption. *J Dent* 1995; 23:313–8.
17. Gonçalves TS, Schmitt VM, Thomas M, Souza MAL, Menezes ML. Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. *Angle Orthod.* 2008; 78: 926-30.

18. Harrison A, Huggett R. Effect of the curing cycle on residual monomer levels of acrylic resin denture base polymers. *J Dent.* 1992; 20:370-4.
19. Haywood J, Basker RM, Watson CJ, Wood DJ. A comparison of three hard chairside denture reline materials. Part I. Clinical evaluation. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2003; 11: 157-63.
20. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J.* 1988; 21: 89–99.
21. Hensten-Pettersen A, Jacobsen N. Toxic effects of dental materials. *Int Dent J.* 1991; 41: 265-73.
22. Horák D, Kroupová J, Slouf M, Dvůrák P. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based slabs as a mouse embryonic stem cell support. *Biomaterials.* 2004; 25:5249-60.
23. Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont.* 2001; 14: 439-43.
24. Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J Dent.* 2000; 28: 61-7.

25. International Standard Organization. ISO 10993-5:1992. Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. Ginebra: ISO;1992.
26. Jagger RG. Effect of the curing cycle on some properties of a polymethylmethacrylate denture base material. *J Oral Rehabil.* 1978;5:151–7.
27. Jerolimov V, Huggett R, Brooks SC, Bates JF. The effect of variations in the polymer/monomer levels and flexural properties of denture base materials. *Quintessence Dent Technol.* 1985; 9:431– 4.
28. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent.* 2003; 90: 190-3.
29. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 2004; 17: 340-4.
30. Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL, Carlos IZ. Effect of the post-polymerization heat-treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14: 203-7.

31. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology*. 2007; 24: 52-7.
32. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Hoshino Y, Takagi N, Kawano J. High-performance liquid chromatographic estimation of eluates from denture base polymers. *J Dent*. 1989; 17: 84-9.
33. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J. Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. *Dent Mater*. 1990; 6: 13-6.
34. Lai YL, Chen YT, Lee SY, Shieh TM, Hung SL. Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. *J Oral Rehabil*. 2004; 31: 1165-72.
35. Lee SY, Lai YL, Hsu TS. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate. *Eur J Oral Sci*. 2002; 110: 179-83.
36. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent*. 1994; 72:644-50.

37. Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1995; 8:122-8.
38. Lopes Jesus AJ, Ermelinda Eusébio M, Redinha JS, Leitão MLP. Enthalpy of solvation of butanediols in different solvents. *Thermoch Acta.* 2000; 344:3-8.
39. Lunder T, Rogl-Butina M. Chronic urticaria from an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis.* 2000; 43: 232-3.
40. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR, Berg E. Leaching of organic additives from dentures in vivo. *Acta Odontol Scand.* 1993; 51: 45-51.
41. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching from denture base materials in vitro. *Acta Odontol Scand.* 1995; 53:75-80.
42. Lygre H, Klepp KN, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching of additives and degradation products from cold-cured orthodontic resins. *Acta Odontol Scand.* 1994; 52: 150-6.
43. Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC. Effect of a heat-treatment on the linear dimensional change of a hard chairside relined resin. *J Prosthet Dent.* 2002; 88:611-5.
44. McCabe JF, Basker RM. Tissue sensitivity to acrylic resin. *Br Dent J* 1976;140:347-50.

45. Merdad K, Pascon AE, Kulkarni G, Santerre P, Friedman S. Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact millipore filter assays. *J Endod.* 2007; 33:24-7.
46. Mosmann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
47. Niu Q, Zhao C, Jing Z. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 2001; 251:11–9.
48. Nocca G, Lupi A, De Santis F, Giardina B, De Palma F, Chimenti C, Gambarini G, De Sole P. Effect of methacrylic monomers on phagocytes reactive oxygen species: a possible BDDMA modulating action. *Luminescence.* 2008; 23:54-7.
49. Price CA. The effect of cross-linking agents on the impact resistance of a linear poly(methyl methacrylate) denture-base polymer. *J Dent Res.* 1986; 65:987-92.
50. Rimmer S, German MJ, Maughan J, Sun Y, Fullwood N, Ebdon J, MacNeil S. Synthesis and properties of amphiphilic networks 3: preparation and characterization of block conetworks of poly(butyl methacrylate-block-(2,3-propandiol-1-methacrylate-stat-ethandiol dimethacrylate)). *Biomaterials.* 2005; 26:2219-30.

51. Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF. Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. Measurement of their residual monomer output and cytotoxicity. *J Orofac Orthop.* 2000; 61:246–57.
52. Ruiz-Genao DP, Moreno De Vega MJ, Sanchez Perez J, Garcia-Diez A. Labial edema due to an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis.* 2003; 48: 273-74.
53. Ruyter IE. Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand.* 1980; 38: 17-27.
54. Sadamori S, Shigeto N, Hamada T, Okuda K. A method of determining residual monomer in acrylic resin using methyl ethyl ketone. *Aust Dent J.* 1990; 35:509–13.
55. Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB. Relationships between denture base resin cytotoxicity and cell lipid metabolism. *Int J Prosthodont.* 1995; 8:580-5.
56. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1997; 10:73-7.
57. Shim JS, Watts DC. Residual monomer concentrations in denture-base acrylic resin after an additional, soft-liner, heat-cure cycle. *Dent Mater.* 1999; 15:296-300.

58. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 2002; 23:1819-29.
59. Sofou A, Tsoupi I, Emmanouil J, Karayannis M. HPLC determination of residual monomers released from heat-cured acrylic resins. *Anal Bioanal Chem* 2005; 381:1336–46.
60. Stafford GD, Brooks SC. The loss of residual monomer from acrylic orthodontic resins. *Dent Mater*. 1985; 1:135–8.
61. Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Citotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of tissue culture insert as a testing device. *J Biomedic Mater Res*. 1999; 45:214-22.
62. Tsuchiya H, Hoshino Y, Kato H, Takagi N. Flow injection analysis of formaldehyde leached from denture-base acrylic resins. *J Dent* 1993; 2:240-3.
63. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and citotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resins denture base materials. *J Prosthet Dent*. 1994; 71:618-24.

64. Turner TD, Spyratou O, Schmidt J. Biocompatibility of wound management products: Standardization of and determination of cell growth rate in L 929 fibroblast cultures. *J Pharm Pharmacol* 1989; 41:775–80.
65. Üzüüm ÖB, Durukan HB, Kundakci S, Karadag E. Water uptake and dye sorption studies of chemically crosslinked highly swollen novel ternary acrylamide-based hydrogels including citraconic acid and sodium acrylate. *Polymer Adv Tech*. 2008; 19:775-84.
66. Upadhyay P, Bhaskar S. Real time monitoring of lymphocyte proliferation by an impedance method. *J Immunol Methods*. 2000; 244:133–7.
67. Urban VM, Cass QB, Oliveira RV, Giampaolo ET, Machado AL. Development and application of methods for determination of residual monomer in dental acrylic resins using high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2006; 20: 369-76.
68. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, de Almeida FG, et al. Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside relines resins. *Dent Mater*. 2009; 8. [Epub ahead of print].

69. Vallittu PK. The effect of surface treatment of denture acrylic resin on the residual monomer content and its release into water. *Acta Odontol Scand.* 1996; 54:188-92.
70. Vallittu PK, Ruyter IE, Buykuilmaz S. Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:588-93.
71. Vallittu PK. Unpolymerized surface layer of autopolymerizing polymethyl methacrylate resin. *J Oral Rehabil.* 1999; 26:208-12.
72. Vergani CE, Seo RS, Pavarina AC, dos Santos Nunes Reis JM. Flexural strength of autopolymerizing denture reline resins with microwave postpolymerization treatment. *J Prosthet Dent.* 2005; 93:577-83.
73. Wagner U, Burkhardt E, Failing K. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the ³H-thymidine incorporation assay. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 70:151-9.
74. Wennberg A. Cell culture in the biological evaluation of dental materials: a review. *Altern Lab Anim* 1986; 13: 194–202.
75. Yatabe M, Yasuda N, Ai M, Okabe Y. Unpolymerized layer on autopolymerizing, hard reline materials. *Int J Prosthodont.* 1999; 12: 129-34.

76. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.* 1997; 37:517-24.
77. Yunus N, Harrison A, Huggett R. Effect of microwave irradiation on the flexural strength and residual monomer levels of an acrylic resin repair. *J Oral Rehabil.* 1994; 21:641– 8.

Apêndices

9 Apêndices

Apêndice 1 – Dados obtidos no testes de incorporação do ³H-Timidina.

	Resina	Replicatas		
1ª Repetição	T	2876	3089	2810
	R1	2543	3027	2821
	R2	2151	2108	2104
	Controle	7464	6860	6867
2ª Repetição	T	611	571	539
	R1	1021	910	921
	R2	548	544	611
	Controle	2032	2114	2645
3ª Repetição	T	941	790	984
	R1	1188	1386	1359
	R2	999	972	1108
	Controle	2968	2674	2474

Apêndice 2 – Dados obtidos no testes do MTT

	Resina	Replicatas		
1ª Repetição		540-620nm		
	T	0,1402	0,1444	0,1015
	R1	0,1514	0,1619	0,1153
	R2	0,1514	0,1821	0,14
	Controle	0,2092	0,206	0,1983
2ª Repetição		540-620nm		
	T	0,0939	0,0998	0,0909
	R1	0,0818	0,0882	0,0840
	R2	0,0880	0,0837	0,0861
	Controle	0,1230	0,1257	0,1223
3ª Repetição		540-620nm		
	T	0,1050	0,1014	0,1060
	R1	0,1026	0,1061	0,1084
	R2	0,1115	0,1033	0,1192
	Controle	0,1594	0,1223	0,1278

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 19 de março de 2009.

Cristiane Campos Costa