



**UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”**

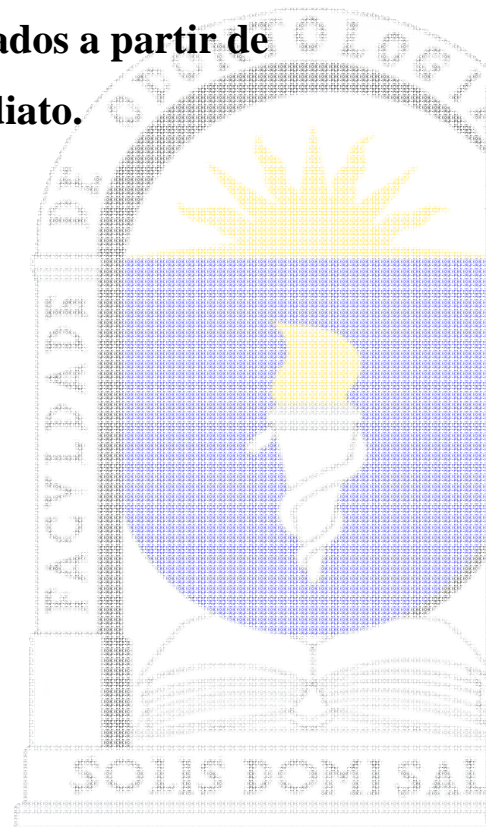
Faculdade de Odontologia de Araraquara

CAROLINA DE ANDRADE LIMA CHAVES

**Avaliação in vitro da citotoxicidade de monômeros,
plastificante e produtos de degradação liberados a partir de
resinas para reembasamento imediato.**

Araraquara

2009



UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara

CAROLINA DE ANDRADE LIMA CHAVES

**Avaliação in vitro da citotoxicidade de monômeros,
plastificante e produtos de degradação liberados a partir de
resinas para reembasamento imediato.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de prótese, da Faculdade de odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Prótese.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Machado

Co-Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara

2009

Chaves, Carolina de Andrade Lima

Avaliação in vitro da citotoxicidade de monômeros, plastificante e produtos de degradação liberados a partir de resinas para reembasamento imediato / Carolina de Andrade Lima Chaves . – Araraquara: [s.n.], 2009.

157 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Machado

Co-orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

1. Citotoxicidade imunológica 2. Reembasadores de dentadura
3. Bases de dentadura I. Título

CAROLINA DE ANDRADE LIMA CHAVES

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE DE MONÔMEROS,
PLASTIFICANTE E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO LIBERADOS A PARTIR
DE RESINAS PARA REEMBASAMENTO IMEDIATO**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Ana Lúcia Machado

2º Examinador: Ana Cláudia Pavarina

3º Examinador: Cláudia Helena Lovato da Silva

Araraquara, 17 de Abril de 2009.

DADOS CURRICULARES

CAROLINA DE ANDRADE LIMA CHAVES

Nascimento: 11 de Agosto de 1982 – Recife/PE.

Filiação: Tarcísio Cavalcanti Chaves e Abigail de Andrade Lima Chaves.

2000/2005: Curso de Graduação - Faculdade de Odontologia de Caruaru/ASCES.

2006: Participação no Programa de Aperfeiçoamento Continuado (PROAC) –
Disciplinas de prótese total e fixa– Departamento de Prótese e Materiais Dentários-
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

2007/2009: Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Concentração em
Prótese – Curso de Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Dedico este trabalho...

À ***Deus***, por cuidar da minha vida com tanto carinho.

Aos meus pais ***Tarcísio e Abigail***, por terem proporcionado o suporte necessário para que eu vença essa etapa da minha vida. Pelo amparo, dedicação, apoio incondicional às minhas decisões, pela minha formação pessoal e valores que me foram passados: humildade, sinceridade, educação e amor a Deus e à família. Foi com o apoio e amor de vocês que hoje consigo conquistar este sonho!

A minha irmã, ***Fabiana***, e aos meus avós, ***Cleonice e Paulo***, pela preocupação, companheirismo, carinho, amor e incentivo.

Ao meu querido ***Raphael***, pelo incentivo incondicional, apoio, carinho, compreensão, paciência e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Muito obrigada por tudo. Você foi muito importante nesta etapa da minha vida!

Agradecimentos especiais

A Profa. Dra. ***Ana Lúcia Machado***, por acreditar em mim, pela confiança, incentivo e contribuição na minha formação profissional. A senhora é um exemplo de dedicação, competência e seriedade a docência. Fui privilegiada de poder ser orientada por você, eu não poderia ter tido mais sorte. Muito obrigada por tudo!

A Prof. Dra. ***Iracilda Zeppone Carlos***, pela disponibilidade e incentivo. Obrigada por me deixar fazer parte do seu laboratório de pesquisa.

As professoras e amigas, ***Simone Xavier*** e ***Anamaria Pessoa Pereira Leite***, pela amizade, incentivo e, principalmente, por acreditar em mim. Obrigada!

A minha amiga de pós-graduação ***Cristiane***, pela sua amizade, companhia no laboratório e troca de informações. Estudamos muito para que nossos trabalhos fossem concluídos com êxito, muito obrigada pela sua companhia!

Agradecimentos

À *coordenadoria do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral*, muito obrigada por tornar possível a realização do meu trabalho.

A todos os *Professores do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral*, em especial ao *Prof. Dr. Luis Geraldo Vaz, Prof. Dr. Gelson Luís Adabo, Prof. Dr. Carlos Alberto Cruz e Profa. Dra. Cínara Maria Camparis*, pelos conhecimentos, apoio e acolhida.

Aos professores da disciplina de prótese removível *Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina, Profa. Dra. Eunice Giampaolo e Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani*, pela amizade, convivência e incentivo.

As amigas de infância *Dani Moroni, Amanda, Carol Fernandes, Izabela, Renatinha Sarmento, Renata Da Fonte, Bia e Mariana*; E as amigas da faculdade *Fabiana, Aline, Maria, Duda, Carol Cavalcanti, Rafaela, Juliana, Maradulce e Willyanne* muito obrigada pela convivência e apoio por todos estes anos. Sei que mesmo de longe, vocês torcem pela minha vitória. Obrigada por tudo!

Aos amigos do curso de pós-graduação *Tatiane, Fernanda, Carlos, Rodrigo, Antônio, Fabiane, Ângela, Patrícia, Cristiane, Ana Lúcia, Camila, Ana Paula, Flávia Zardo e Flávia Medeiros*, obrigada pela convivência e amizade.

Aos *amigos do laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial a Djamile, Lívia, Dani e Lucas*, obrigada pela paciência, amizade, companheirismo e ensinamentos.

A técnica de laboratório *Marisa*, pela paciência e amizade. Muito obrigada pela ajuda para a conclusão do meu trabalho.

Aos *funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese*, pela ajuda e amizade.

Aos *funcionários da Seção de Pós-Graduação Mara, Alexandre, Flávia e Rosângela*, obrigada pela gentileza e atenção.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida ao curso de mestrado.

À FAPESP, pelo auxílio à pesquisa (processo 2007/06710-9).

Lista de abreviaturas e símbolos

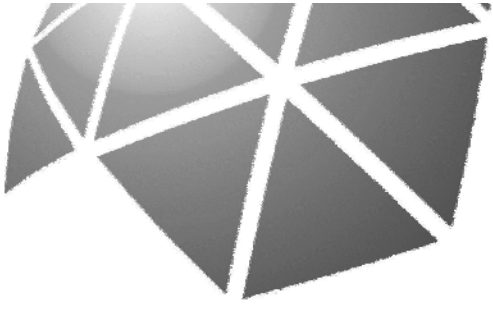
- AB - Ácido benzóico
- AM - Ácido metacrílico
- BA - *n*-butil acrilato
- BA - Banho em água
- BBP - Butil benzil ftalato
- 1,4 – BDMA - 1,4-Butanediol dimetacrilato
- BMA - Butil metacrilato
- BPA - Bisfenol A
- BPBG - *n*-butil ftalil *n*-butil glicolato
- Bis-GMA - Bisfenol A glicerolato dimetacrilato
- cm - Centímetro
- cpm - Contagem por minuto
- CQ - Canforoquinona
- DBP - Di-*n*-butil ftalato
- DBS - Ester di-*n*-butil
- DEHP - Di(2- etilhexil) ftalato
- DMA - *n*-dodecyl metacrilato
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DOA - Di(2-etilhexil) adipato
- DPPC - Método de lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina
- EHMA - 2-etil exil-metacrilato
- 2,3-EMA - Ácido 2,3-epoximetacrílico
- EMPA - 1,2-epoxi-2-ácido metilpropiónico

- EMPME - 2,3-epoxi-2-metil-ácido propiônico metil éster
- g – Grama
- GMA - Glicidil metacrilato
- h - Horas
- 1,6 - HDMA - 1,6 - Hexanediol dimetacrilato
- HEMA - 2-Hidroxiethylmetacrilato
- HMA - Hexil metacrilato
- HPLC- Cromatografia líquida de alta resolução
- IBMA - Isobutil metacrilato
- K – Kooliner
- LL - Light Liner
- L – Lucitone 550
- M - Molar
- μg - Micrograma
- mg - Miligramas
- μl – Microlitro
- μm - Micrômetro
- μmol - Micromol
- μCi – Micro-querly
- mL – Mililitro
- mm – Milímetro
- mM – Milimolar
- mmol - Milimol
- min – Minuto
- MBuP - Mono-n-butil ftalato

- MMA - Metil metacrilato
- MPa – Mega-pascal
- nmol - Nanomol
- NT - New Truliner
- PB - Peróxido de benzoíla
- PBN - n-tert-butil- α -fenilnitrona
- PBS - Solução salina fosfatada \
- PEMA - Polietil metacrilato
- PMMA – Polimetil metacrilato
- s - Segundos
- TEG - Trietileno glicol
- TEGDMA - Trietileno glicol dimetacrilato
- TMPT - Trimetilolpropano trimetacrilato
- TR – Tokuso Rebase
- U - UfiGel Hard
- UDMA - Uretano dimetacrilato

SUMÁRIO

Resumo	13
Abstract	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
3 PROPOSIÇÃO	95
4 MATERIAL E MÉTODO	97
4.1 Materiais	97
4.1 Métodos	99
5 RESULTADO	111
6 DISCUSSÃO	121
7 CONCLUSÃO	138
8 REFERÊNCIAS	140
9 APÊNDICES	152



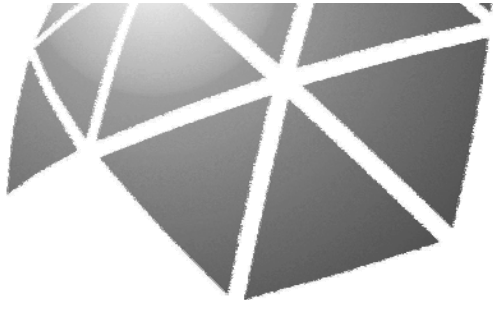
RESUMO

Resumo

Chaves CAL. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de monômeros, plastificante e produtos de degradação liberados a partir de resinas para reembasamento imediato [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico dos monômeros isobutil metacrilato (IBMA) e 1,6 – Hexanediol dimetacrilato (1,6 – HDMA), do plastificante di-*n*-butil ftalato (DBP), e dos produtos de degradação ácido metacrílico (AM) e ácido benzóico (AB) sobre células L929. Esses compostos foram testados em faixas de concentrações liberadas, em um período de 30 dias, por materiais reembasadores rígidos, previamente quantificadas em estudos anteriores. O efeito citotóxico foi verificado por meio dos testes de MTT e ³H-timidina, após as células terem sido expostas às substâncias testadas nas concentrações estabelecidas. A classificação da citotoxicidade foi baseada na viabilidade celular em relação ao controle (células expostas ao meio sem as substâncias testadas). A atividade de síntese de DNA foi inibida por todos os compostos. Os resultados do presente estudo demonstraram que o teste de ³H-timidina foi mais sensível que o teste de MTT e que os compostos avaliados mostraram diferentes níveis de citotoxicidade *in vitro*. A atividade da desidrogenase mitocondrial diminuiu nas células tratadas com os monômeros, o plastificante e o produto de degradação AM; porém, para o AB, a maioria das concentrações testadas não apresentou efeito citotóxico.

Palavras-chave: Citotoxicidade imunológica; reembasadores de dentadura; bases de dentadura.



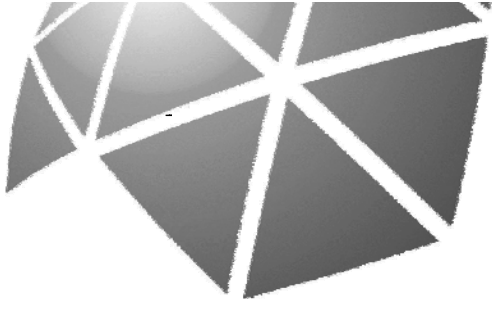
ABSTRACT

Abstract

Chaves CAL. In vitro cytotoxicity of monomers, plasticizer and degradation by-products released from hard chair side relined resin [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effect of the monomers 1,6 – hexanediol dimethacrylate (1,6 - HDMA) and isobutyl methacrylate (IBMA), the plasticizer di-n-butyl phthalate (DBP), and the degradation by-products methacrylic acid (MA) and benzoic acid (BA) on L929 cells. These compounds were tested in the range of concentrations released in 30 days from hard chairside relined resins that were quantified in previous investigations. Cytotoxic effects were assessed by using MTT and ³H - thymidine assays after the cells had been exposed to the test compounds at the given concentrations. Cytotoxicity was rated based on cell viability relative to controls (cells exposed to medium without test substances). The results presented in this study demonstrated that the ³H-thymidine assay was more sensitive than the MTT assay, and all compounds tested showed varying degrees of cytotoxic effect in vitro. DNA synthesis activity was inhibited by all compounds. Mitochondrial dehydrogenase activity decreased in cells treated with monomers, plasticizer and MA by-product, whereas no cytotoxic effect was observed on contact with BA at the majority of concentrations tested.

Key-Word: Immunologic cytotoxicity; denture liner; denture base.



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Devido ao processo de reabsorção óssea, que é crônico, progressivo, irreversível e de origem multifatorial, o rebordo residual apresenta constante alteração morfológica. Assim, pacientes total ou parcialmente desdentados, reabilitados por meio de próteses removíveis, apresentam como um dos aspectos críticos do tratamento a manutenção da adaptação entre a parte interna das bases e os tecidos de suporte. Como método alternativo ao reembasamento mediato, o método imediato permite a readaptação das próteses aos tecidos de suporte no próprio consultório, eliminando as fases de inclusão e prensagem, sendo por esse motivo, mais rápido e de fácil execução¹¹. Assim, o reembasamento imediato tem sido indicado, apresentando resultados clínicos considerados favoráveis¹⁹.

Diferindo das resinas acrílicas comumente utilizadas, que são compostas de polímero e monômero contendo polimetilmetacrilato e metacrilato de metila, para o reembasamento imediato têm sido utilizadas resinas autopolimerizáveis especialmente formuladas para essa finalidade. Esses materiais são fornecidos em forma de pó composto de polietil metacrilato (PEMA) e de um líquido que pode ser à base de butil metacrilato (BMA), isobutil metacrilato (IBMA) ou 1,6 - hexanediol dimetacrilato (1,6 - HDMA)^{2,62}.

Durante a reação de polimerização, a conversão das moléculas de monômero em polímero não é completa, permanecendo certa quantidade de monômero residual na resina polimerizada⁵⁵, sendo esse conteúdo usualmente maior

nas resinas ativadas quimicamente que naquelas ativadas pelo calor⁶⁴. O monômero residual apresenta ação plastificante e pode afetar as propriedades dos materiais^{32,46}. Em função desses aspectos, um estudo inicial foi realizado para avaliar o conteúdo de monômero residual em 4 resinas autopolimerizáveis para reembasamento imediato e 1 resina termopolimerizável para base de prótese⁶². Os resultados confirmaram a presença de monômero residual em todos os materiais, com diferenças significativas entre as resinas para reembasamento imediato avaliadas, tendo sido a quantidade de monômero detectada em 3 delas significativamente maior que a da resina termopolimerizável.

O monômero residual também pode influir na biocompatibilidade dos materiais poliméricos^{8,11,17,25-27,31,34,60}. Além de serem citotóxicos⁸, podem causar irritação química local⁶⁴, hipersensibilidade (alergia)^{1,65}, inflamação na mucosa, vesículas e ulcerações¹, sensação de queimação¹ e reação alérgica sistêmica³⁸. Além do monômero residual, outros componentes das resinas acrílicas devem ser considerados do ponto de vista da biocompatibilidade. Dentre esses componentes, podemos destacar os plastificantes, que são incluídos na formulação para proporcionar flexibilidade e melhorar as características de trabalho dos materiais. Geralmente, são utilizados ftalatos e ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos^{18,24,29,67}. Hashimoto et al.¹⁸, em 2000, em trabalho in vitro, avaliaram materiais condicionadores de tecidos e concluíram que os ésteres de ftalatos possuem atividade estrogênicas. Existe ainda a possibilidade de serem mutagênicos, agentes

hepatotóxicos e carcinogênicos⁶⁷. Outro aspecto que deve ser considerado é que, durante sua utilização, os materiais poliméricos estão sujeitos a influências químicas, mecânicas e térmicas^{32,39}, que podem resultar em sua degradação e conseqüente formação de vários sub-produtos. Dentre esses produtos de degradação podemos citar os ácidos metacrílico (AM) e benzóico (AB)^{30,55}, que têm sido considerados potencialmente tóxicos em diferentes níveis e tempos, cujos efeitos se prolongam por vários dias após a polimerização³³. Esses produtos também podem atuar como agentes sensibilizantes, podendo causar irritação ou reações alérgicas tardias^{1,17}.

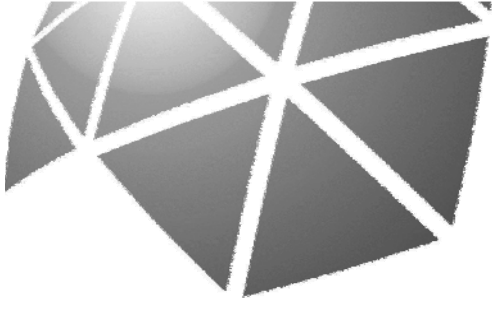
Um fator importante a ser considerado é que, para que os componentes presentes na resina polimerizada, como monômero residual, plastificantes e produtos de degradação, apresentem efeito tóxico é necessário que sejam liberados para o meio a partir dos materiais e, dessa forma, entrem em contato com os tecidos da cavidade bucal. Tem sido observado que somente parte do monômero residual presente em materiais poliméricos pode ser extraído ou liberado⁶¹⁻⁶³. Com base nessas informações, um estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a possível liberação de monômeros residuais, plastificante (di-n-butil ftalato - DBP) e dois produtos de degradação (AM e AB) a partir das resinas para reembasamento imediato Kooliner (K), New Truliner (NT) e UfiGel Hard (U)⁶¹. Para isso, os materiais foram imersos em saliva artificial e, após períodos pré-determinados, coletas foram obtidas e analisadas por meio de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Foi observado que o monômero IBMA foi liberado a partir das resinas K e NT e o

monômero 1,6 - HDMA da resina U. Foi também observado a liberação de DBP a partir da resina NT, que apresenta esse plastificante em sua composição², e dos produtos de degradação AM e AB a partir de todas as resinas avaliadas. Entretanto, os possíveis efeitos tóxicos dessas concentrações ainda não foram investigados. Outro aspecto importante é que, enquanto vários autores avaliaram a citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese^{25-28,34,50,60}, poucos avaliaram esse aspecto em resinas para reembasamento imediato^{8,11,31}. Além disso, nesses estudos, embora alguns materiais tenham sido relatados como citotóxicos, os componentes responsáveis por essa citotoxicidade não foram identificados. Somente no trabalho de Lai et al.³¹, em 2004, os testes de citotoxicidade foram realizados utilizando-se os monômeros das resinas K e TR. Entretanto, as concentrações avaliadas foram estabelecidas de maneira aleatória e não com base em resultados de liberação. Além disso, o efeito de outros componentes que podem ser liberados, como produtos de degradação e plastificantes, não foi avaliado. Assim, a citotoxicidade das diferentes concentrações de componentes liberados por resinas utilizadas para o reembasamento imediato precisa ainda ser investigado em maiores detalhes.

A fim de minimizar os efeitos deletérios causados pela presença de componentes residuais, e tornar a resina mais aceitável biologicamente e com melhores propriedades mecânicas, estudos têm avaliado diferentes tratamentos, realizados após a polimerização^{26,60,62}, com o objetivo de reduzir a quantidade desses compostos. Tem sido observado que a imersão de resinas acrílicas polimerizadas em

água aquecida a 55° C por 10 min pode reduzir tanto o conteúdo de monômero residual⁶¹ como também a liberação desse composto e de outros componentes^{61,63}. As concentrações máximas de IBMA, 1,6 – HDMA, DBP e AB liberadas de todas as resinas foram significativamente reduzidas após esse tratamento. Redução nas quantidades de AM liberadas também foi observada, com exceção da resina U^{61,63}. Da mesma forma como relatado anteriormente, os possíveis efeitos citotóxicos das concentrações obtidas após o tratamento de pós-polimerização por imersão em água aquecida, também precisam ser analisados.

Tendo em vista o exposto, foi considerado oportuno realizar um estudo para avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos monômeros IBMA e 1,6 - HDMA, do plastificante DBP e dos produtos de degradação AM e AB nas concentrações máximas liberadas a partir de resinas para reembasamento imediato, submetidas ou não a tratamento de pós-polimerização^{61,63}. Essa avaliação é particularmente relevante considerando-se que, para se analisar o efeito tóxico de biomateriais, tem sido recomendado identificar e quantificar os compostos por eles liberados^{28,31,60}.



REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Quando respostas alérgicas às resinas acrílicas são observadas, os principais agentes responsáveis são os monômeros residuais, capazes de produzirem estomatites e queilites angulares. Giunta et al.¹⁶, em 1979, relataram um caso clínico de eritema multiforme devido a provisório confeccionado com resina autopolimerizável. Paciente do sexo feminino, 57 anos de idade, fumante, sem relato de alergias anteriores e que não fazia uso de nenhum medicamento, foi atendida para reabilitação protética do arco superior. Os dentes anteriores foram preparados ao nível da gengiva marginal e um provisório de resina acrílica autopolimerizável (Cold-pak), confeccionado pela técnica indireta, foi cimentado com o material Temp-Bond. Após dois dias, a paciente relatou desconforto na gengiva marginal devido à prótese temporária. No período de uma semana, todos os dentes superiores foram preparados e a prótese temporária colocada até a região posterior. Um dia depois, a paciente apresentou dificuldade de fala e de deglutição, com sensação de queimação na cavidade bucal. Na avaliação clínica, foi observada estomatite severa e vermelhidão generalizada. Existiam também lesões vesículo-bolhosas com áreas de coagulação e necrose no assoalho bucal e na superfície interna do lábio, além de outras lesões severas no palato duro e mole. O diagnóstico clínico foi de eritema multiforme, que tem como principal fator etiológico a reação alérgica à resina. A prótese foi removida, imersa em água aquecida sob pressão por 20min para remoção do monômero não polimerizado e cimentada com Temp-bond. Medicamento para reduzir o edema e solução para bochecho, para diminuir a dor, foram prescritos. Os sintomas reduziram na primeira noite e, após 4 dias, todos os sinais e sintomas haviam desaparecido. Decorridos dois meses, foi realizado o teste de contato no qual nenhuma reação foi observada para o cimento temporário enquanto reações moderada e severa foram

observadas para a resina acrílica e o monômero líquido, respectivamente, tendo sido comprovado que o monômero residual havia sido o responsável pela reação alérgica observada.

Desde a década de 30, quando as resinas acrílicas foram introduzidas no mercado, existem vários relatos de reações a próteses confeccionadas com esses materiais. De acordo com a revisão de literatura realizada por Weaver, Goebel⁶⁵, em 1980, essas reações frequentemente incluem sintomas como ardência na língua e outras regiões da cavidade bucal, vermelhidão e erosões na mucosa oral. As causas desses sintomas podem estar relacionadas com vários fatores como trauma devido à prótese mal adaptada, irritação química local causada pela resina ou seus constituintes, hipersensibilidade (alergia) à resina acrílica ou aos seus componentes ou outras doenças sistêmicas e bucais não relacionadas com as resinas acrílicas. Existem relatos bem documentados tanto de reações de hipersensibilidade como irritação local causadas pelo monômero metil metacrilato. As resinas autopolimerizáveis contêm concentrações maiores de monômero residual e podem causar injúria química local, sensibilização, ou reação alérgica em pacientes previamente sensibilizados. As resinas também contêm aditivos que ainda não foram completamente investigados e podem, em alguns casos, serem responsáveis por reações. Para minimizar essas reações, a utilização de resinas termopolimerizáveis adequadamente processadas é recomendada. Quando se utilizam próteses provisórias confeccionadas em resinas autopolimerizáveis, os métodos indiretos devem ser preferidos aos métodos diretos intra-orais para prevenir o contato direto de altas concentrações de monômero com a mucosa oral. A injúria química direta é mais provável de ocorrer do que uma reação alérgica.

Danilewicz-Stysiak¹², em 1980, realizou testes *in vitro* de citotoxicidade para dois tipos de monômeros utilizados na odontologia: monômero com 99% de MMA e um líquido de

resina acrílica para próteses dentárias (MP). O experimento foi realizado com fibroblastos de embriões de galinhas e os monômeros dissolvidos em meio de cultura nas seguintes concentrações: 2 mg/ml; 1,5 mg/ml; 0,0075 mg/ml; 0,005 mg/ml; 0,0025 mg/ml; e 0,001 mg/ml. Essas concentrações foram baseadas em estudo piloto que essas substâncias foram letais às células em concentrações entre 1 a 2 mg/ml, com o limite de toxicidade variando de 0,01 e 0,001 mg/ml. Durante o experimento, o meio de cultura das células foi substituído a cada três dias, avaliando-se o crescimento celular por meio de microscópio óptico regularmente. Após sete dias de contato das células com os monômeros, a cultura foi fixada em álcool metílico e corada com hematoxilina e eosina. O crescimento celular foi determinado de acordo com o coeficiente mitótico das células. Os resultados mostraram que, após sete dias em contato com os monômeros, esses coeficientes variaram de 35 a 124. Rápido crescimento celular foi observado nas culturas com pequenas concentrações de monômeros, diminuindo com o aumento dessas concentrações, não sendo observado crescimento celular nos meios contendo altas concentrações dos monômeros. As modificações na morfologia celular também foram correlacionadas com as concentrações de monômeros às quais as células foram expostas, sendo observadas as seguintes alterações: distúrbios nas estruturas da célula, degeneração progressiva do protoplasma e destruição dos núcleos. Para o MP, a dose letal para as células foi de $\geq 1,5$ mg/ml e para o MMA, foi de 2 mg/ml. As doses mínimas de MP e MMA abaixo da qual não foram observadas diferenças com relação ao controle (células cultivadas sem monômeros), foram de 0,0025 mg/ml e 0,01 mg/ml, respectivamente. Foi concluído que o MMA tem efeito citotóxico; porém, o MP, que possui em sua composição outros componentes, foi mais citotóxico do que o monômero puro, indicando que os produtos adicionados ao monômero MMA tem potencial citotóxico.

Na literatura, existem relatos de reações alérgicas ao monômero metil metacrilato. Testes de contato com a pele demonstraram que alguns pacientes e profissionais da área odontológica também eram hipersensíveis ao formaldeído. Dessa forma, Ruyter⁴⁷, em 1980, realizou um estudo com o objetivo de avaliar a liberação e a origem do formaldeído em resinas acrílicas para base de próteses. Foram selecionados 9 materiais, sendo 3 resinas termopolimerizáveis (Paladon 65, Swe Base e SR 3/60) e 6 resinas autopolimerizáveis, sendo 3 fluidas (Palacast, Swe Flow e Ivocast) e 3 convencionais (Palapress, Swebond Compact e Quick 20). Corpos-de-prova (50 mm X 0,5 mm) foram confeccionados de acordo com as instruções dos fabricantes e colocados em soluções aquosas de dimedone, saturadas com ar ou argônio, para que o formaldeído fosse liberado, sendo as soluções analisadas por meio do método HPLC. Também foi analisado o conteúdo de MMA e agentes de ligação cruzada de cada resina e a formação de formaldeído por meio da reação entre o oxigênio e o monômero metil metacrilato. Os resultados mostraram que, as três resinas termopolimerizáveis apresentaram menor liberação de formaldeído quando comparadas com as outras 6 resinas. Em relação à composição dos líquidos, as resinas autopolimerizáveis apresentaram diferentes tipos de agentes de ligação cruzada, sendo o 1,4-butanediol dimetacrilato encontrado em 2 resinas (1 convencional e 1 fluida). As demais resinas autopolimerizáveis foram divididas em duas categorias: uma com baixo teor e outra com alto teor do agente de ligação cruzada etileno glicol dimetacrilato. Após 4 semanas a 37°C, a reação entre MMA e oxigênio formou uma mistura contendo monômero MMA, metil piruvato, formaldeído e copolímero oxigênio-metilmetacrilato. O formaldeído pode ser formado como produto da: 1) oxidação durante o período da reação de polimerização; 2) quebra do co-polímero oxigênio-metil metacrilato; 3) oxidação do monômero metil metacrilato residual presente na resina polimerizada.

Em 1981, Hensten-Pettersen, Wictorin²⁰, realizaram estudo para verificar a citotoxicidade de duas resinas acrílicas para base de prótese termopolimerizáveis (SR 3/60 e Dura-Flow), duas fluidas autopolimerizáveis (Swe-Flow e Palacast) e duas autopolimerizáveis convencionais (Quick 20 Pink e Quick 20 Clear) correlacionando a influência da citotoxicidade com diferentes formas de armazenamento. Corpos-de-prova em formato de discos (40 mm X 4 mm) foram confeccionados, de acordo com as recomendações dos fabricantes e de forma asséptica. Para a resina termopolimerizável, A SR 3/60 foram utilizados dois processos de polimerização: (1) 73 °C por 30min, sendo a temperatura aumentada até 100°C e mantida por 30min; (2) 73 °C por 9h. Apenas o primeiro ciclo foi utilizado para a resina Dura-Flow. Para todas as resinas autopolimerizáveis, foram utilizados dois métodos de polimerização: (1) 21 °C por 1h; (2) 45 °C com pressão com 2 Kpa por 30min. Discos de vidro com as mesmas dimensões foram utilizados como controle. Os corpos-de-prova foram, então, submetidos a duas condições prévias ao teste: armazenamento em água destilada por 1 a 4 dias; colocação em atmosfera umidificada por 2 semanas. Para o teste de citotoxicidade, os corpos-de-prova (controle e experimentais) foram colocados no fundo de placas de Petri. Células do epitélio oral humano (NCTC 2544), foram adicionadas, na proporção de $0,6 \times 10^6$ em meio Eagle, e as placas incubadas a 37 °C com CO₂, por períodos de até 4 dias ou 2-3 semanas. Após os períodos de incubação, os corpos-de-prova foram lavados com solução salina, transferidos para outra placa de petri com solução de tripsina. Depois de 5min de incubação a 37 °C, as células foram suspensas e contadas como o auxílio do aparelho Celloscope 101. Os resultados mostraram que as células ao redor dos corpos-de-prova possuíam morfologia normal não tendo sido observada zona de inibição do crescimento celular em nenhuma das culturas. Para as resinas Swe-Flow (autopolimerizável fluida), Quick 20 Pink e Quik 20 Clear (autopolimerizáveis convencionais), o

crescimento celular foi de 40 a 60% em comparação com o grupo controle. A resina Palacast apresentou menor crescimento celular e a SR3/6, taxas intermediárias. Não houve diferença na citotoxicidade quanto aos tipos de polimerização utilizados. Em relação ao armazenamento, não houve diferenças significativas no crescimento celular para as resinas SR 3/60 e Swe-Flow, enquanto a resina Quick 20 apresentou diminuição na citotoxicidade com o tempo. De acordo com os resultados obtidos, a classificação das resinas em função do método de polimerização não está diretamente relacionada com o potencial citotóxico das substâncias por elas liberadas.

Muitos testes biológicos requerem a mensuração da sobrevivência e/ou proliferação celular, que pode ser realizada por diferentes métodos como contagem de células mortas coradas ou não, mensuração de proteínas marcadas com ^{51}Cr após lise celular, marcação e mensuração da incorporação de nucleotídeos radioativos (^3H - timidina ou [^{125}I] iododeoxiuridina) durante a proliferação celular. Dessa forma, Mosmann⁴⁴, em 1983, realizou um estudo para verificar um novo método de mensuração de células viáveis que fosse rápido e capaz de avaliar grande número de amostras. Para isso, o autor utilizou espectrofotômetro (leitor de ELISA), que mensura grande número de amostras com alto grau de precisão, e investigou a possibilidade de usar uma reação de alteração de cor como medida do número de células viáveis. Idealmente, um método colorimétrico para se avaliar células viáveis deveria utilizar um substrato incolor que seja modificado em um produto colorido por células viáveis mas não por células mortas ou pelo meio de cultura. Os sais de tetrazólio foram considerados pelo autor como adequados para esse propósito, tendo em vista que eles medem a atividade da enzima desidrogenase. O anel tetrazólio é quebrado na mitocôndria ativa e, assim, a reação ocorre somente em células viáveis. Experimentos iniciais foram realizados com vários sais de tetrazólio,

tendo sido o reagente mais promissor o MTT [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)], um substrato de cor amarelo claro que produziu o formazan azul escuro quando incubado com células viáveis. O método desenvolvido foi considerado versátil e quantitativo, e um avanço sobre as técnicas tradicionais usualmente utilizadas nos testes de proliferação e citotoxicidade. Para testar o método proposto, diferentes linhagens de células foram utilizadas. Os resultados mostraram que a absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas, que possuem uma atividade mitocondrial que gera um sinal forte, sugerindo que a quantidade de cristais de formazan formados por cada célula depende do nível de metabolismo de energia. Além disso, o método é capaz de detectar pequenos números de células viáveis (200 células/orifício). A principal vantagem do método colorimétrico é a rapidez com que as amostras podem ser processadas. O substrato não interfere com a mensuração do produto e, nas condições estabelecidas pelo autor, os componentes do meio também não interferem. Isso permite que a leitura seja realizada sem a necessidade de fases de remoção ou lavagem, o que aumenta a rapidez do teste e auxilia a minimizar a variabilidade entre amostras. As leituras podem ser realizadas logo após a colocação do ácido isopropanol, para dissolver os cristais de coloração azul escura, e a cor é estável por algumas horas a temperatura ambiente. Uma ressalva feita pelo autor foi que, enquanto o método colorimétrico mensura o número e a atividade celular no fim do teste, o ensaio por incorporação de ^3H - timidina mede o número de células que sintetizaram DNA durante as últimas horas do teste. Assim, esse método pode potencialmente diferir daqueles que utilizam a incorporação de nucleotídeos radiativos. Esse fato deve ser considerado para aplicações específicas, ou seja, fazer a distinção entre os aspectos que serão avaliados: morte, viabilidade ou proliferação celular.

Tem sido relatado que o monômero metil metacrilato pode causar reação de hipersensibilidade na mucosa oral e pele, quando sua polimerização não foi completa e ele é liberado na cavidade oral. Ali et al.¹, em 1986, realizaram estudo com pacientes que apresentavam sensação de ardência bucal e eram usuários de prótese total. Foram utilizados exames hematológicos e de urina, para verificar eventuais problemas sistêmicos; questionário de avaliação psicológica; teste de contato com a pele para verificar sensibilidade ao metil metacrilato ou outros componentes das resinas acrílicas; cromatografia gás/líquida de alta resolução para análise de monômeros residuais; avaliação quanto à presença de infecção por *Candida albicans*. Foram selecionados 22 pacientes que relataram ardência bucal e 22 pacientes usuários de próteses, sem alterações bucais ou sistêmicas (controle). Os resultados mostraram que todos os 22 pacientes que apresentaram a sensação de ardência relataram que coincidiu com a colocação das próteses. Além da ardência na região dos tecidos superiores em contato com as próteses, 15 pacientes relataram essa sensação em outros locais como língua, mucosa labial e tecido da faringe. Falhas de estabilidade, ajuste ou oclusão foram encontradas em 12 (55%) dos pacientes. Não foram encontradas evidências de infecção por *Candida* em nenhum dos 44 pacientes. Nos exames hematológicos, 2 pacientes apresentaram anemia e, nos de urina, 1 paciente apresentou glicosúria. No teste psicológico, 11 (50%) dos pacientes do grupo experimental apresentaram alteração, enquanto no grupo controle, alterações foram observadas em 4 pacientes. Foi observado que, dos 22 pacientes do grupo experimental, 16 (73%) das próteses apresentaram níveis de monômero residual maiores que 0,3%. Cinco pacientes apresentaram reação positiva de alergia no teste de contato. Uma nova polimerização das próteses, a imersão em água quente ou a substituição por próteses novas, diminuíram os sintomas

em 4 pacientes. Nenhum dos pacientes do grupo controle apresentou resultado positivo para o teste de alergia por contato.

Para que ocorra a sensibilização dos pacientes, o monômero residual precisa ser liberado da prótese para a saliva, por meio da qual ele é conduzido até a mucosa oral ou, após a deglutição, até o trato gastro-intestinal. Em função desses aspectos, Baker et al.⁵, em 1988, realizaram o primeiro estudo in vivo para detectar a presença de MMA na saliva, no sangue e na urina de 6 voluntários dentados saudáveis que utilizaram aparelhos removíveis. Os aparelhos foram confeccionados com a resina autopolimerizável Orthoresin (poli metilmetacrilato - PMMA), polimerizada durante 10min a 50°C e pressão de 204 kPa, ou com a resina termopolimerizável Lucitone 199, também a base de PMMA, processada com ciclos de 1, 3, 5 ou 7h a 70 °C. A liberação do monômero foi detectada até o período de uma semana de utilização dos aparelhos. A quantidade total de monômero liberado de aparelho confeccionado em resina autopolimerizável na primeira hora foi de 6,2 a 29,5 µg/mL. Nenhum monômero foi detectado na saliva dos pacientes que utilizaram aparelhos confeccionados com a resina termopolimerizável processada com ciclos de 3h ou mais, enquanto para aqueles processados por período de 1h a 70 °C, houve liberação de 6,3 µg/mL. A concentração de monômero residual na resina polimerizada foi maior na região superficial do que na parte interna. Além disso, a quantidade de monômero obtido a partir da saliva presente na superfície interna de um dos aparelhos confeccionados com a resina autopolimerizável foi de 180 µg/mL, superior ao valor de 40 µg/mL observado na amostra total de saliva obtida do mesmo paciente. Essa alta concentração local de monômero provavelmente poderia causar sensibilização ou desencadear resposta alérgica na mucosa da região do palato, esclarecendo porque, em casos de estomatite alérgica, a inflamação é

frequentemente restrita a área recoberta pela prótese. No exame do sangue e urina dos pacientes, não foi detectado MMA, provavelmente por ter se apresentado em pequenas concentrações. Os autores realizaram alguns experimentos para avaliar as possíveis causas de redução da concentração de MMA na saliva. Foram testadas as hipóteses de oxidação, evaporação ou hidrólise do monômero em ácido metacrílico, tendo sido esta última considerada a mais provável. Segundo os autores, as bases das próteses são constantemente banhadas pela saliva e enzimas oxidativas também poderiam estar envolvidas na degradação do MMA, que ocorreu de forma mais rápida na saliva que em água. A maior parte do MMA foi liberada nas primeiras 24h após a colocação dos aparelhos confeccionados com a resina autopolimerizável e nenhuma liberação foi detectada quando os aparelhos foram imersos em água por 24h previamente a sua colocação nos pacientes, sendo esse procedimento recomendado pelos autores.

Para investigar o mecanismo de interação do eugenol com a membrana de odontoblastos comparando-o com aqueles do fenol e trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA), Fujisawa et al.¹⁵, em 1988, empregaram o método de lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Nenhum sinal devido ao eugenol no DPPC/eugenol lipossoma foi observado, indicando que a maior parte foi incorporado na dupla camada de lipídios e não se difundiu para o meio externo aquoso. Foi observado, ainda, que o efeito solubilizante do eugenol foi maior que o do fenol e que o efeito do eugenol na membrana depende da concentração utilizada. O sinal do TEGDMA no DPPC/TEGDMA lipossoma foi dividido em dois picos: um pico menor (TEGDMA livre) e um pico maior (membrana-vinculado TEGDMA). A quantidade de TEGDMA que foi incorporado na membrana foi menor que a do eugenol, sugerindo que os grupos etileno glicol do TEGDMA atuaram nos DPPC lipossomas

como surfactantes e solubilizaram a camada lipídica. Dessa forma, os autores sugerem que, em geral, os monômeros metacrilatos são incorporados na superfície da dupla camada das biomembranas e a membrana lipídica é solubilizada.

Nos testes de biocompatibilidade *in vitro*, todavia, diferentes técnicas têm sido propostas para assegurar contato adequado dos materiais avaliados com as células, envolvendo tanto o contato direto como o indireto. Wennberg⁶⁶, em 1988, sugeriu o método de filtro Millipore que consiste em um ensaio de citotoxicidade baseado em contato indireto células/materiais onde as células crescem em um lado do filtro e o material testado é colocado do lado oposto. Para a realização do teste, filtros de Millipore em forma de discos (47 mm de diâmetro), com poros de 0,45 μm , foram colocados em placas de petri. Células epiteliais humanas (HeLa) ou fibroblastos de hamsters (L929) foram preparadas em suspensão, colocadas para cobrir o filtro e a placa incubada por 24h a 37°C em atmosfera umedecida com 5 % de CO₂. Para estabelecer o contato material/célula, foi preparado 5 ml de Bacto-agar (3%), com a mesma quantidade de meio Eagle, colocado em uma nova placa de petri. O filtro Millipore com as células aderidas foi lavado com solução salina fosfatada (PBS), pré-aquecida a 37 °C, e colocado sobre o ágar solidificado. Do lado contrário ao das células, amostras dos materiais testados foram colocadas e o disco incubado por 2h. Após esse período de contato célula/material, o filtro com as células aderidas foi removido, lavado com PBS, colocado em glutaraldeído para a fixação das células, imerso em hematoxilina e eosina sendo, posteriormente, cortado em tamanhos apropriados e imerso em xilol. Os filtros com as células aderidas também foram incubados por 3h para demonstração citoquímica da succinato-desidrogenase e, logo após, examinados macroscopicamente. Os resultados mostraram que filtros de Millipore, com poros de 0,45 μm ,

são suficientes para fixar as células e compatíveis com a maior parte dos materiais, com exceção dos cimentos de policarboxilato, que aderem ao filtro podendo causar danos. O método também permitiu avaliar a atividade enzimática como um indicador do metabolismo celular, utilizando a succinato-desidrogenase, que forma um precipitado com coloração somente onde há atividade enzimática, ou seja, dentro das células vivas. Assim, o autor concluiu que o presente teste pode ser utilizado para citotoxicidade independente do estado físico do material a ser testado, sendo uma técnica simples, rápida e de reprodução fácil, baseada na atividade enzimática.

Na cavidade bucal, as próteses são continuamente lavadas por saliva e cobertas por placa que podem apresentar baixo pH, em função da fermentação e dieta, expondo, dessa forma, as próteses a condições ácidas. Assim, Koda et al.³⁰, em 1990, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a associação de liberação de produtos por resinas acrílicas e o meio ácido. Para isso, foi analisada, quantitativamente, a liberação de ácido benzóico, ácido metacrílico, metacrilato de metila e acrilato de metila a partir de resinas acrílicas imersas em saliva artificial com diferentes pHs (de ácido a neutro), por meio do HPLC. Foram utilizadas três resinas acrílicas com diferentes tipos de polimerização: autopolimerizável (Rebaron nº 3), termopolimerizável (Acron nº 8) e polimerizada por microondas (Acron MC nº 8). Corpos-de-prova em forma de disco (8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foram confeccionados, colocados em frascos tampados contendo saliva artificial apresentando diferentes pH (4, 5, 6 e 6,8) e incubados a 37° C. Os resultados mostraram que o ácido benzóico, o metacrilato de metila e o ácido metacrílico foram liberados por todas as resinas. Houve maior liberação de substâncias químicas pela resina autopolimerizável quando comparada com os outros dois métodos de polimerização e a quantidade de metacrilato de metila, ácido benzóico e ácido metacrílico

aumentou com o tempo de imersão. Com relação ao pH, a concentração de metacrilato de metila foi maior nas soluções com pH mais baixo (4,0). Em pH mais alto (6,8), a concentração de metacrilato de metila diminuiu enquanto a de ácido metacrílico aumentou, provavelmente devido à hidrólise do metacrilato de metila. Nenhuma relação entre o pH e as concentrações de ácido benzóico liberadas foi observada. As variações de pH da saliva podem modificar as ações adversas das resinas acrílicas autopolimerizáveis por alterar as proporções das concentrações relativas entre o metacrilato de metila e o ácido metacrílico. Os resultados também sugerem que as ações tóxicas das resinas autopolimerizáveis podem ser atribuídas, potencialmente, ao metacrilato de metila sob condições mais ácidas e ao ácido metacrílico em condições de menor acidez.

Condicionadores teciduais são produtos compostos por polietil metacrilato ou polímeros similares, ésteres plastificantes, que podem ser citotóxicos, e álcool como solvente. Okita, Hensten-Pettersen⁴⁵, em 1991, utilizaram o método de ágar “overlay” para testar a citotoxicidade dos reembasadores teciduais temporários Coe Comfort (CC), GC Soft Liner (GC), Kerr FITT (KF) e Visco-gel (VG). Os corpos-de-prova de cada material, foram preparados assepticamente com diâmetro de 12 mm e espessura de 2 mm, polimerizados a temperatura de 37 °C por 30min. Após esse período, os corpos-de-prova foram armazenados em meio de cultura por 1h, 24h, 8 dias e 15 dias a 37 °C. Corpos-de-prova dos materiais logo após a manipulação também foram avaliados. Para o teste de citotoxicidade, fibroblastos de hamster L929 ($6,1 \times 10^5$ células) foram colocadas em placas de petri e, após 2 dias, o meio de cultura foi removido e 5 ml de meio de cultura contendo 1% de agarose foi adicionado. Quando esse material solidificou, as células foram coradas com vermelho neutro por 15min a 37 °C. Os corpos-de-prova foram, então,

colocados sobre a superfície do ágar. Polietileno e polivinilcloro foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Após 24h de incubação a 37 °C em atmosfera de 4% CO₂, a cultura foi examinada em microscópico avaliando-se a zona de inibição e o índice de lise celular e a soma dos índices de reação (IR). Os resultados mostraram que o controle negativo não causou nenhuma alteração nas células, e o controle positivo induziu a morte celular. Os testes realizados com corpos-de-prova logo após a manipulação e aqueles com corpos-de-prova armazenados pelos períodos de 1 e 24h, demonstraram que todos os materiais testados foram citotóxicos. O índice IR revelou que os materiais CC e KF foram mais citotóxicos que GC e VG. Para os períodos de 24h, 8 e 15 dias, os condicionadores de tecidos CC e KF continuaram sendo mais citotóxicos que os outros materiais (GC e VG). Um dos fatores que foram relacionados com a citotoxicidade observada foi a presença de plastificantes, usualmente ésteres ftalatos, na composição dos materiais.

Tem sido observado que o PB, embora não mutagênico, produz danos ao DNA celular, sendo um promotor de tumor, e que essa ação seria mediada por radicais livres derivados desse composto. Estudos prévios viram que o metabolismo do PB em queratinócitos ocorre via clivagem inicial da ligação do peróxido, gerando radicais benzoiloxil que, por sua vez, fragmentam-se em radicais fenil e dióxido de carbono ou átomos de hidrogênio e ácido benzóico (AB). AB é o produto mais estável do PB produzido pelos queratinócitos. Dessa forma, Swauger et al.⁵⁶, em 1991, estudaram o efeito do PB e seus produtos de degradação em induzir cisão do DNA celular. O PB produziu danos no DNA de forma dose-dependente, com faixa de concentração superior de 0,1-1mM, necessitando da presença de cobre. Em contraste, AB não produziu danos no DNA celular, tanto na presença como na ausência de cobre. A inclusão de

alguns produtos como o n-tert-butil- α -fenilnitrono (PBN), 3,5-dibromo-4-nitro benzenosulfonato e nitroso-benzeno reduziram significativamente o grau de lesões no DNA causado através da ativação do PB pelo cobre. Esses resultados demonstraram que os radicais livres são os responsáveis pelos danos ao DNA observados. As análises em espectroscopia de ressonância eletrônica paramagnética sugeriram que o principal radical da decomposição do PB capturado pelo PBN foi o radical benzoiloxil. Essas informações sugerem que as ligações do PB podem ser clivadas na presença de cobre, resultando na formação do radical benzoiloxil o qual pode produzir danos ao DNA celular.

Foram introduzidas no mercado, resinas acrílicas fotopolimerizáveis para base de próteses. Logo após, fabricantes sugeriram o uso de selantes resinosos para proporcionar a essas resinas lisura superficial a fim de reduzir o acúmulo de placa bacteriana, além de promover maior dureza e resistência à abrasão. Para testar a biocompatibilidade desses materiais, Lefebvre et al.³⁶, em 1992, realizaram teste de citotoxicidade para dois selantes (Palaseal e Extoral) utilizados com três resinas fotopolimerizáveis (Triad, Astron LC Hard e Extoral) e uma polimerizada em banho de água quente como controle (Lucitone 199). Foram confeccionados, em condições assépticas, 3 corpos-de-prova em forma de disco (1 cm X 1 mm), para cada material, sendo as resinas fotopolimerizáveis processadas de duas formas: (1) sem barreira de ar; (2) com barreira de ar (removida, posteriormente, com escova estéril e água, e lavada em água destilada por 30s). Os corpos-de-prova foram divididos em três grupos: um sem selante, e os outros dois grupos, cada um com um dos selantes selecionados, polimerizados de acordo com instruções dos fabricantes. Para o teste de citotoxicidade, foram utilizadas células epiteliais de hamsters e a síntese de proteínas foi monitorada por meio da incorporação do radioisótopo ³⁵S-metionina. Os resultados

mostraram que o selante Extoral apresentou menor inibição de produção de proteínas em comparação ao grupo sem aplicação de selante. Para o Palaseal, a resposta foi oposta, resultando em maior citotoxicidade que a resina sem este selante. Os resultados indicaram que o selante Extoral protege as células do efeito tóxico dos componentes das resinas, enquanto o selante Palaseal aumenta esse efeito. Com relação aos corpos-de-prova com barreira de ar, apesar de o Palaseal ter tornado as resinas menos citotóxicas nessa condição experimental, o Extoral apresentou melhores resultados de citotoxicidade em todas as resinas testadas. Assim, foi observado que o uso de um selante bem selecionado pode reduzir a citotoxicidade das resinas para base de próteses.

O monômero metil metacrilato residual presente nas bases das próteses de resina acrílica pode ser liberado e entrar em contato com a mucosa oral, principalmente na região dos tecidos de suporte. Existem vários relatos de reação alérgica ou de irritação da mucosa causadas por próteses confeccionadas com esses materiais. Assim, Sadamori et al.⁴⁸, em 1992, realizaram estudo com o objetivo de verificar o conteúdo de monômero residual em bases de próteses e estimar sua redução durante longos períodos de utilização. Para a realização do experimento, foram utilizadas 24 próteses totais superiores, das quais foram retiradas pequenas porções da região posterior (0,2 mg, aproximadamente). As amostras foram colocadas em tubos contendo metil etil cetona e armazenadas por 96h a 4°C. Em seguida, 25 µl de p-xilol foram adicionados aos tubos e levados para a centrifugação. O extrato foi analisado pelo método HPLC. Os resultados mostraram que a taxa de monômero residual variou de 0,12% a 4,22%. Além disso, o conteúdo de monômero residual foi usualmente menor nas próteses em utilização por períodos longos que naquelas em utilização por período curto de tempo. Isso sugere que, apesar de existir

liberação de monômero residual por muitos anos, o conteúdo de monômero residual das resinas acrílicas para base de próteses diminui com o aumento do tempo de utilização, e a maior liberação ocorre nos primeiros 5 anos.

As resinas fotopolimerizáveis para próteses podem ser classificadas de acordo com o modo de polimerização em polimerizada apenas por luz visível (PVL), ou com luz visível e quimicamente polimerizada (dual). Essas resinas possuem um tratamento superficial para impedir o contato com o oxigênio da atmosfera e favorecer a maior conversão dos monômeros presentes. Dessa forma, Barron et al.⁶, em 1993, realizaram estudo para comparar a biocompatibilidade, através da análise *in vitro* da síntese de DNA e RNA em células do epitélio oral de hamsters, de uma resina PLV (Triad) e de duas resinas de polimerização dual (Astron LCH e Extoral), com uma resina polimerizada em banho de água quente (Lucitone 199). Para cada resina, foram preparados três corpos-de-prova (10 mm de diâmetro X 1 mm de espessura) variando o tempo de polimerização (5 ou 10 min). Três tratamentos foram avaliados: sem aplicação da barreira de ar, com aplicação da barreira de ar após a polimerização e aplicação de barreira de ar após a polimerização, seguida da escovação do corpo-de-prova com escova e água estéreis. Para o teste de citotoxicidade, células do epitélio oral de hamsters ($4,5 \times 10^5$) foram colocadas em orifícios de placas de cultura de células contendo os discos de resina. Após 24h de incubação a 37 °C com 5 % de CO₂, cada cultura foi examinada utilizando microscópio de contraste de fase. Para a verificação da síntese de DNA e RNA, após as 24h de incubação inicial, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo 15 µCi/mL de ³H-Uridine, para marcar o RNA e 4 µCi/mL de ³H-Timidina para marcar DNA e incubada por mais 24h. Os resultados mostraram que, após 24hs de exposição aos corpos-de-prova, as células em contato

com as resinas para reembasamento (PVL ou dual) não apresentaram características normais. Contudo, as que estavam em contato com a resina polimerizada em banho de água quente apresentaram normalidade. Todas as resinas para reembasamento, nas diferentes condições experimentais, apresentaram inibição da síntese dos nucleotídeos em comparação ao grupo controle. O aumento do tempo de polimerização diminuiu a citotoxicidade das resinas Astron LCH e Triad. A utilização da barreira de ar pode aumentar o grau de citotoxicidade em algumas delas (Astron LCH e Extoral). As resinas PLV e dual apresentaram-se mais tóxicas que a resina polimerizada em água quente (Lucitone 199) e, dos dois nucleotídeos analisados, o DNA foi mais sensível no teste de citotoxicidade. Os autores também relataram que os efeitos citotóxicos poderiam estar relacionados com a presença de constituintes não polimerizados nas resinas ou com sub-produtos da polimerização.

Algumas resinas para base de prótese e materiais reembasadores resilientes possuem plastificantes em suas composições. Até 1992, entretanto, não existiam relatos na literatura sobre a liberação desses plastificantes na cavidade oral. Desta forma, Lygre et al.⁴⁰, em 1993, realizaram estudo com o objetivo de quantificar plastificantes presentes na saliva de indivíduos usuários de próteses removíveis. Foram selecionados 4 homens e 7 mulheres que utilizavam prótese, com média de idade de 67,8 anos. Novas próteses foram confeccionadas utilizando a resina termopolimerizável (Vertex 5RS) de acordo com as instruções do fabricante. Para identificar as substâncias liberadas na saliva pelas próteses, corpos-de-prova (26 x 26 x 3 mm) foram confeccionados sob as mesmas condições das próteses, e colocados em recipientes de vidro contendo 80 ml de etanol, cobertos com folha de alumínio e levados para agitação por 20h a 37 °C. Em seguida, as amostras foram analisadas pela espectrometria de massa associada à

cromatografia a gás, para identificação dos diferentes produtos liberados a partir de cada amostra. Foram coletadas amostras de saliva dos pacientes com a prótese antiga e após uma semana de utilização das próteses novas. Como grupo controle, foram coletadas amostras de saliva de 11 indivíduos que não usavam prótese, com média de idade de 22,9 anos. Os resultados mostraram que dibutil ftalato e fenil benzoato foram encontrados na saliva dos pacientes com próteses novas, porém não foram detectados nas amostras de saliva do grupo controle ou durante a utilização das próteses antigas. Dessa forma, foi concluído que os aditivos dos polímeros para base de próteses (plastificantes) são liberados na saliva de indivíduos que utilizam próteses recentemente confeccionadas em condições clínicas normais.

Algumas substâncias liberadas pelas resinas para base de próteses são responsáveis por reações adversas nos tecidos orais, entre as quais o formaldeído. Assim, Tsuchiya et al.⁵⁹, em 1993, realizaram experimento para quantificar o formaldeído liberado por resinas para base de prótese, com diferentes tipos de polimerização. Foram selecionadas uma resina autopolimerizável (Rebaron nº 3), uma termopolimerizável (Acron nº 8) e uma polimerizada por meio de microondas (Acron MC nº 8). Corpos-de-prova em forma de disco (8,5 mm X 2 mm) foram confeccionados, colocados em frascos de vidro com água destilada que foram mantidos sob leve agitação em banho de água a 37 °C. Aliquotas de 50 a 70 µl foram coletadas em diferentes intervalos de tempo e analisadas pelo método de injeção em fluxo com detector de fluorescência. Para avaliar a influência do tempo na quantidade de substâncias liberadas, 10 discos de resina autopolimerizável foram colocados em frascos contendo saliva artificial e incubados a 37 °C; 5 destes corpos-de-prova, tiveram a camada superficial de inibição removidas com lixa de carbeto de silício. A cada dia, a quantidade de formaldeído e de

metacrilato de metila liberada foi determinada pela análise da injeção em fluxo e por cromatografia líquida de alta resolução. Os frascos contendo os discos de resina autopolimerizável eram lavados e novas alíquotas de saliva artificial eram colocadas após cada análise. Os resultados indicaram que a quantidade acumulada de formaldeído liberado a partir da resina autopolimerizável foi maior nas amostras coletadas após 10 dias de imersão em saliva artificial do que naquelas coletadas nos intervalos de 1 e 5 dias. Além disso, os discos de resina autopolimerizável que tiveram a camada de inibição removida liberaram menor quantidade de formaldeído quando comparadas aos discos não desgastados. Os discos de resina termopolimerizável e os polimerizados por microondas liberaram menor quantidade de formaldeído quando comparados com os de resina autopolimerizável. 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. A liberação de metacrilato de metila também seguiu padrão similar. A provável causa da formação do formaldeído liberado neste estudo seria a oxidação do monômero residual metacrilato de metila.

Lefebvre et al.³⁴, em 1994, realizaram estudo com o objetivo de verificar a citotoxicidade de produtos liberados por 4 resinas para bases de próteses fotopolimerizáveis (Triad, Triad High Flow, Astron LC Hard e Extoral) e uma resina termopolimerizável (Lucitone 199), em diferentes tempos. Foram confeccionados, em condições assépticas e de acordo com instruções dos fabricantes, 3 discos para cada material nas seguintes dimensões: 1 cm de diâmetro e 1 mm de espessura. Para o preparo dos eluatos, as amostras foram colocadas em frascos contendo meio de cultura por 24h, em uma mesa giratória. Os discos foram transferidos

para meios de cultura recém preparados diariamente durante 10 dias e os eluatos obtidos foram armazenados por dois períodos antes dos testes de citotoxicidade: 24h e 30 dias a 4 °C. Para a realização desses testes, células epiteliais de hamster, suspensas em 50 µl de meio de cultura contendo as substâncias liberadas e 50 µl de meio de cultura fresco foram colocadas em placas de cultura e incubadas por 24h ou 48h. Orifícios contendo somente células e meio de cultura sem os eluatos foram utilizados como controle. Para a análise da citotoxicidade, foram utilizados os testes MTT, que verifica a produção de enzima desidrogenase mitocondrial, e a monitorização da síntese de RNA por meio da incorporação de radioisótopo. Os resultados mostraram que os componentes liberados pelas resinas acrílicas termo ou fotopolimerizáveis podem causar efeito tóxico às células epiteliais orais. As diferenças nos padrões de toxicidade observadas nos vários períodos de imersão em que os eluatos foram obtidos (de 1 à 10 dias), principalmente após 24h de incubação das células com esses eluatos, podem estar relacionadas com o grau de polimerização e quantidade de carga e densidade dos materiais. Diferenças nesses aspectos poderiam influenciar a quantidade de componentes liberados e a velocidade de liberação. Os diferentes níveis de toxicidade observados também sugerem que a liberação de componentes tóxicos das resinas pode continuar por vários dias após a polimerização. Para os eluatos que foram armazenados durante 30 dias antes dos testes, que foram avaliados pelo teste de MTT com períodos de 4, 24 e 48h de incubação, foi observado um aumento significativo na atividade enzimática após 4h. Essa atividade diminuiu ou desapareceu nos testes de MTT de 24 a 48h, e os eluatos obtidos no segundo dia de imersão dos discos, quando incubados com as células por 48h, proporcionaram resultados semelhantes ao controle. Segundo os autores, os resultados obtidos sugerem que a imersão das próteses em água por 24h antes da colocação nos pacientes pode minimizar a exposição dos tecidos a substâncias citotóxicas.

No início da década de 80, foram desenvolvidas as resinas para base de prótese fotopolimerizáveis. Embora essas resinas não contenham MMA, elas possuem bis-GMA que também pode ser tóxico. Dessa forma, Lefebvre, Schuster³³, em 1994, apresentaram uma revisão dos estudos por eles realizados para avaliar a citotoxicidade de três resinas mais comumente utilizadas (Triad, fotopolimerizável; Extoral e Astron, de polimerização dual). Nesses estudos tem sido utilizados corpos-de-prova em forma de discos (1 cm X 1 mm) e células do epitélio oral de hamster. Três tipos de corpos-de-prova foram avaliados: 1-polimerizados sem o agente inibidor de oxigênio; 2- aplicação do agente inibidor de oxigênio, que foi mantido na superfície da resina após a polimerização; 3-fotopolimerizado com o agente inibidor de oxigênio, que foi removido da superfície da resina após a polimerização, utilizando-se escova estéril e água. Como controle, foi utilizada a resina acrílica Lucitone 199, termopolimerizável de alto impacto. Após período de incubação, foram realizados diferentes testes: efeito sobre as proteínas celulares, síntese de RNA e DNA, que foram mensurados com a utilização dos radioativos metionina, uridina, e timidina, respectivamente. Os resultados mostraram que, dos testes utilizados a síntese de proteína e de DNA apresentaram maior resposta aos efeitos tóxicos das resinas que a síntese de RNA. Provavelmente as etapas associadas com o metabolismo de proteína e de DNA devem ser menos diversificadas que aquelas envolvidas na síntese de RNA, sendo, portanto, mais sensíveis. Do ponto de vista clínico, a resposta do DNA tem implicações mais sérias, resultando em substituição mais lenta das células basais e, conseqüentemente, numa mucosa mais fina. Em geral, as resinas fotopolimerizáveis foram mais citotóxicas que a termopolimerizável Lucitone 199 e as resinas de polimerização dual foram menos citotóxicas que as polimerizadas apenas por luz, sendo a Extoral a que menos inibiu o crescimento celular. A aplicação do inibidor de oxigênio da resina Extoral não afetou a toxicidade. Entretanto, para as resinas Triad e Astron a

utilização do agente inibidor aumentou significativamente os efeitos tóxicos. Com o objetivo de proporcionar superfícies lisas que auxiliem a reduzir a formação de placa e aumentar a resistência do material à abrasão e à ação de agentes de limpeza, os fabricantes têm recomendado a utilização de selantes (Palaseal e Extoral) que são aplicados após a polimerização. Esses selantes também poderiam reduzir a toxicidade dos materiais. Assim, a aplicação desses selantes nas resinas Triad, Extoral e Astron foi avaliada em relação à toxicidade. Quando comparados às resinas sem selante, o Palaseal resultou em maior inibição da síntese de proteínas enquanto a aplicação do Extoral diminuiu a toxicidade das resinas. Os autores avaliaram, também, o tipo e a biocompatibilidade dos produtos liberados pelas resinas. Foram realizados testes de liberação e extração das resinas após períodos de 24, 48 e 72h de imersão em água, metanol ou acetonitrila. Várias substâncias foram detectadas, tendo sido observado que as resinas liberaram componentes similares. Em outros estudos, foram avaliados a toxicidade dos produtos liberados pelas resinas imediatamente após a obtenção dos eluatos ou após eles terem sido armazenados por 30 dias à 4° C. Os eluatos foram obtidos em diferentes períodos de imersão dos discos das resinas em meio de cultura. Os resultados indicaram que mais de uma substância tóxica é liberada pelas resinas recém polimerizadas, porém os níveis parecem ser sub-tóxicos após vários dias de armazenamento.

As respostas teciduais às resinas acrílicas para bases de próteses são usualmente atribuídas ao monômero MMA, porém o formaldeído liberado desses materiais também pode causar danos aos tecidos. Assim, Tsuchiya et al.⁵⁵, em 1994, realizaram estudo para verificar a liberação de monômero metil metacrilato e formaldeído de resinas acrílicas a base de metil metacrilato, assim como a citotoxicidade desses componentes e testar um método simples para

diminuir a liberação. Foram avaliadas três tipos de resinas (Rebaron nº 3 - autopolimerizável, Acron nº 8 - termopolimerizável e Acron MC nº 8 - polimerizada por meio de microondas). Corpos-de-prova (8,5 mm X 2 mm) foram confeccionados e divididos em dois grupos: imersão em saliva humana ou saliva artificial, ambos incubados a 37° C. Discos de resina autopolimerizável também foram inseridos na cavidade oral de indivíduos saudáveis e a saliva coletada. Para quantificar o formaldeído liberado, foi utilizada a análise de injeção em fluxo. A quantidade de metacrilato de metila foi analisada pela cromatografia líquida de alta resolução. Para análise da citotoxicidade, soluções de formaldeído (2,0 à 100,00 nmol/ml) e MMA (0,2 à 10 µmol/ml) foram dissolvidos no meio de cultura contendo células L na concentração de $6,0 \times 10^6$ células/ml, e colocados em uma placa para cultura de células e incubadas à 37 °C, com atmosfera de CO₂, por 2, 3 e 5 dias. Após estes períodos, as células foram suspensas em solução salina e contadas em número de células por cm², utilizando um hemacitômetro. Amostras de resinas acrílicas autopolimerizáveis foram imersas em água a temperatura ambiente, 20° ou 50° C e, após 60min, foi realizada análise da quantidade de substâncias liberadas. Os resultados mostraram que houve liberação de formaldeído e de metacrilato de metila em todos os meios de imersão, a liberação diminuiu com o tempo e o conteúdo liberado in vitro foi maior do que o in vivo. Houve maior liberação de produtos pelas resinas autopolimerizáveis do que pelas resinas polimerizadas por calor e microondas, tendo sido os valores observados, no primeiro dia de imersão, de $41,9 \pm 2,1$ nmol/ml/dia para o formaldeído e de $0,97 \pm 0,06$ µmol/ml para o metil metacrilato. A liberação foi maior no período de um dia e menor no período de um mês. O formaldeído e o metacrilato de metila foram tóxicos às células, porém, o formaldeído mostrou-se citotóxico em menores concentrações. Concentrações de metil metacrilato de 1,0 a 5,0 µmol/ml reduziram o número de células a 50% e 70% em relação ao valor obtido no controle, porém nenhum efeito

tóxico foi observado com concentrações menores que 0,5 µmol/ml. A imersão dos discos de resina acrílica autopolimerizável em água a 50° C reduziu a quantidade de subprodutos liberados. Assim, os autores sugeriram a imersão das próteses de resina acrílica em água a 50° C, por pelo menos 60min , antes da instalação, para diminuir seu potencial citotóxico, principalmente para as resinas autopolimerizáveis utilizadas para a confecção ou o reembasamento de próteses.

Schmalz⁴⁹, em 1994, realizou uma revisão da literatura para verificar as vantagens e limitações do uso de culturas celulares para testes de citotoxicidade. Foi verificado que existem vários métodos de testes *in vitro* que consistem basicamente de três componentes: a) o sistema biológico; b) o contato do material com as células e o aspecto biológico final a ser avaliado; c) os sistemas utilizados para atingir o objetivo. Os sistemas biológicos utilizados podem ser cultura de órgãos, de células e organelas celulares, sendo a mais utilizada para materiais odontológicos a cultura de células tanto de linhagem permanente (que podem ser comercializadas) como de cultura primária (colhidas de indivíduos e mantidas em laboratório). Estudo utilizando o teste ágar-overlay indicou que, independente do tipo de células utilizadas (linhagem permanente ou primária) os principais efeitos observados foram similares. As células de linhagem permanente são bem definidas e geralmente disponíveis, enquanto as de linhagens primárias, apesar de simular melhor as condições clínicas, não são definidas sendo disponíveis somente em determinados laboratórios, devendo ser utilizadas para estudos específicos. O contato dos materiais com as células pode ser feito de forma direta, indireta ou através de eluatos. E, os resultados podem ser analisados considerando-se a morfologia celular ou através de diferentes aspectos biológicos tais como: efeito na membrana celular, atividade celular e taxa de proliferação. Um dos métodos empregados para análise da viabilidade celular é a utilização do

corante azul de tripan, no qual as células mortas são coradas e as viáveis não. Os testes de atividade celular baseiam-se na taxa de metabolismo de certas substâncias, por meio da qual a atividade de uma enzima ou outras substâncias pode ser mensurada. Um dos métodos que tem sido utilizado é a incorporação do radioisótopo ^{14}C -timidina que permite avaliar a síntese de DNA. Os testes de genotoxicidade podem ser realizados com bactérias ou células humanas e o contato material/células pode ser de forma indireta ou por eluato. As vantagens dos métodos de toxicidade *in vitro* consistem na possibilidade de controle das condições experimentais, baixo custo, realização rápida e sem envolver aspectos éticos. E, como limitação, pode ser verificada a falta de simulação das condições *in vivo* e a dificuldade de extrapolar os dados obtidos para os pacientes. Os resultados obtidos em estudos de toxicidade *in vitro* podem somente ser interpretados dentro de uma série de materiais de uma mesma categoria (análise relativa de toxicidade) e a comparação direta e extrapolação dos resultados obtidos em cultura de células para os pacientes não é possível. Estudos *in vivo* com animais demonstram os fenômenos que ocorrem, mas não os mecanismos que os induziram. Os estudos *in vitro* são capazes de elucidar esses mecanismos, porque diferentes aspectos do complexo sistema *in vivo* podem ser investigados, separadamente, em experimentos *in vitro*.

Estudos *in vitro* utilizando estrogênio de mamíferos revelaram que os dois ésteres ftalatos, butil benzil ftalato (BBP) e DBP, são estrogênicos. Esses ésteres ftalatos são comumente utilizados na fabricação de vários produtos plásticos. A presença desses ésteres no meio ambiente e a tendência para acúmulo em gordura animal, por serem lipofílicos, são bem conhecidos. Assim, Jobling et al.²⁴, em 1995, testaram a capacidade estrogênica de 20 compostos, considerados como possíveis contaminantes do meio ambiente, e relataram que alguns deles

podem interagir com o receptor estradiol. Os compostos DBP e BBP foram estrogênicos *in vitro* em concentrações entre 10^{-6} a 10^{-4} M. Houve redução na ligação do estrógeno 17β aos receptores celulares, quando as células foram cultivadas na presença desses compostos. Esses resultados não podem, entretanto, serem utilizados para prever a atividade estrogênica *in vivo*. Considerando-se que todos os ftalatos são lipofílicos, eles apresentam a tendência de se acumular nas células adiposas e podem ser absorvidos pela pele humana. Entretanto, uma vez ingeridos, podem ser metabolizados e eliminados.

Componentes tóxicos podem se difundir em ambientes aquosos e atingir sítios distantes das áreas de contato da mucosa com a resina. Esse fator, agrava-se em pacientes que apresentam a mucosa infectada, inflamada, lacerada ou frágil como resultado de problemas nutricionais ou utilização de medicamentos. Dessa forma, grandes áreas da mucosa podem ser expostas a esses componentes tóxicos durante um prolongado período de tempo. Além disso, sabe-se que a cavidade oral está sujeita a constante variação de pH devido à ingestão de alimentos e líquidos. Com base nessas informações, Lefebvre et al.³⁵, em 1995, realizaram um estudo com o objetivo de verificar o efeito de diferentes pHs sobre a citotoxicidade de uma resina termopolimerizável para base de prótese (Lucitone 199) e duas para reembasamento sendo uma polimerizável por luz visível (Triad) e outra com polimerização dual (Extoral). Corpos-de-prova em forma de discos (1 cm X 1 mm) foram confeccionados em condições assépticas. Para as resinas fotopolimerizada e dual, os corpos-de-prova foram produzidos de duas formas: (1) sem agente inibidor de oxigênio; (2) com agente inibidor de oxigênio (removida com escova estéril e água, e lavada em água destilada por 30s). As preparações dos eluatos foram feitas utilizando-se o tampão Michaelis' barbital (pH 4,0, 5,0 e 6,8) colocado em contato com amostras das resinas e

trocado, diariamente, durante 5 dias. Meio de cultura foi, então, adicionado para obter pH dentro da variação fisiológica (7,2, 7,6, 7,7). Para o teste de citotoxicidade foram utilizadas células epiteliais de hamster e a viabilidade celular foi avaliada pelo RNA, por meio da incorporação do ³H-Uridina e mensuração em contador de cintilação. Os resultados mostraram que apenas os eluatos obtidos até o terceiro dia de imersão das amostras de todas as resinas, apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre alguns pHs. O eluato da resina Lucitone 199, em pH 4,0, produziu inibição significativa na síntese de RNA no primeiro dia e aumento no segundo dia. Para o pH 5,0, o eluato do primeiro dia resultou em aumento em relação ao controle, enquanto no pH 6,8 não apresentou diferença comparado com o controle. A resina Triad, no primeiro dia apresentou inibição da síntese de RNA para todos os pHs e, na análise dos outros dias, pode-se sugerir que, para esta resina, o pH 5,0 é mais citotóxico que os pHs 4,0 e 6,8. A resina Extoral apresentou maior citotoxicidade para os dois primeiros dias, em todos os pHs. Os componentes tóxicos são liberados em diferentes quantidades e velocidades, e a quantidade liberada pode ser afetada pelo pH. Não houve diferenças significativas entre os eluatos obtidos a partir dos corpos-de-prova produzidos sem agente inibidor de oxigênio e com esse agente, removido após a polimerização. O aumento observado em algumas condições experimentais foi relacionado com o fato das células não se apresentarem seriamente comprometidas e compensarem os danos por meio do aumento de várias respostas na sua síntese, como a síntese de RNA.

Biomateriais poliméricos estão sujeitos a influências mecânicas e químicas e podem apresentar degradação e liberação de componentes. Para avaliar a toxicologia dos biomateriais, é recomendável identificar e quantificar os componentes liberados. Dessa forma,

Lygre et al.³⁹, em 1995, realizaram um estudo com o objetivo de separar, identificar e quantificar os componentes orgânicos liberados in vitro de algumas resinas para base de prótese à base de PMMA. Corpos-de-prova (50 mm X 0,5 mm) de cada resina foram confeccionados de acordo com as instruções dos fabricantes. A resina termopolimerizável Vertex 5RS foi submetida a dois tipos de processamento, ambos sob compressão: 1) temperatura de 100° C por 65min; 2) temperatura de 80° C por 45min. A resina autopolimerizável Palpress Vario foi processada a temperatura de 55° C por 15min e a Swebond Compact a 40 °C por 10min, ambas sob compressão de 0,2 MPa. Depois da confecção, os corpos-de-prova foram colocados em solução de Ringer por 7 dias ou em etanol por 20h para a liberação dos produtos. A identificação e quantificação dos produtos liberados pelas resinas para base de prótese foram realizadas através de cromatografia a gás, espectrometria de massa e cromatografia líquida. Quando imersas em solução de Ringer, todas as resinas liberaram quantidades similares de dibutil ftalato, enquanto as substâncias bifenil, dicitclohexil ftalato, e fenil benzoato foram detectados, porém em quantidades abaixo dos limites de quantificação. A liberação em etanol revelou que as quantidades liberadas de dibutil ftalato de todas as resinas também foram similares. Entretanto, houve diferença significativa entre as resinas para as demais substâncias. A resina Swebond Compact liberou maiores quantidades de dicitclohexil ftalato e de bifenil e menores quantidades de fenil salicilato em relação às demais resinas. Para o fenil benzoato, a maior liberação foi observada para a resina Palpress Vario. Quanto maior a temperatura de processamento utilizada, menor foi a quantidade de produtos liberados. Os autores ressaltaram que a liberação de substâncias das resinas a base de polimetacrilato de metila, tais como o monômero metacrilato de metila, ácido metacrílico, ácido benzóico, dibutil ftalato, fenil benzoato, bifenil e formaldeído tem sido relatada na literatura. Os componentes responsáveis pelo efeito citotóxico, todavia, ainda não foram identificados.

Schuster et al.⁵⁰, em 1995, realizaram um estudo com o objetivo de analisar o efeito das substâncias liberadas pelas resinas para bases de próteses no metabolismo de lipídeos de células epiteliais orais de hamsters. Foram selecionadas resinas acrílicas para base de prótese de diferentes polimerizações e composições: Lucitone 199 (resina acrílica termopolimerizável de alto impacto), Triad (resina acrílica fotopolimerizável, à base de uretano dimetacrilato) e Triad Dualine (polimerização dual, livre de monômero metil metacrilato) e Extoral (polimerização dual, composta por poli-metil metacrilato e polietil metacrilato). Foram confeccionados corpos-de-prova, em condições assépticas, na forma de discos (1 cm X 1 mm), de acordo com instruções dos fabricantes. Células epiteliais orais de hamster foram cultivadas em meio de cultura acrescido de 5% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 µl/ml de estreptomicina, incubadas a 37° C com 5% de CO₂. Para a obtenção do eluato (meio de cultura contendo as substâncias liberadas), primeiramente os corpos-de-prova foram mantidos em meio de cultura acrescido de antibióticos e sem soro fetal bovino por 24 ou 48h a 37° C. Após esse período, o meio contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova foi colocado em placas contendo meio de cultura fresco acrescido de soro fetal bovino e células epiteliais orais de hamster, além do radioisótopo ¹⁴C-acetato. As placas foram incubadas por 24h para que os lipídeos celulares fossem marcados e, posteriormente, realizadas as mensurações em um espectrômetro. Para o grupo controle, foram utilizadas células propagadas em meio de cultura suplementado sem discos de resina. As respostas celulares mais acentuadas foram observadas com o eluato obtido da resina Extoral. Os resultados demonstraram que os componentes liberados pelas resinas para bases de próteses podem afetar o metabolismo de lipídeos e possibilitarem alterações nas membranas celulares.

Arima et al.², em 1996, realizaram estudo para analisar a composição e a estrutura de seis materiais reembasadores rígidos autopolimerizáveis (Rebaron, Tokuso Rebase, Mild, Metabase, Kooliner e New Tru Liner). O pó de cada material foi analisado em relação aos seguintes aspectos: composição química, temperatura de transição vítrea, peso molecular e distribuição de partículas. A composição química dos líquidos de cada material também foi analisada. Os métodos utilizados foram espectroscopia infravermelha, HPLC, análise de partículas a laser, cromatografia a gás e espectroscopia de massa, espectroscopia de ressonância magnética e calorimetria diferencial de varredura. Para a composição do pó, foi observado que o material Rebaron apresenta PMMA. A temperatura de transição vítrea desse material (69,1 °C) sugere que o pó também contém plastificante. O pó da resina Metabase contém PEMA e P(MMA/EMA), enquanto o pó dos outros 4 materiais avaliados contém PEMA. Os valores de temperatura de transição vítrea variaram de 68,4 °C (resina Mild) a 97,1 °C (resina Metabase). O peso molecular variou de $1,6 \times 10^5$ à $2,2 \times 10^5$, o que sugeriu que no pó desses materiais são utilizados polímeros com distribuição estreita de peso molecular. A análise das partículas demonstrou que, para as resinas Rebaron, Mild, Kooliner, Metabase e New Tru Liner, o tamanho variou de 50 à 100 μm , enquanto para o material Tokuso Rebase os valores foram entre 20-50 μm . Os resultados das análises dos líquidos demonstraram que a resina Rebaron contém MMA e éster di-n-butyl (DBS), a resina Mild contém 2-etil exil-metacrilato (EHMA), 2-hidroxi etil metacrilato (HEMA), trimetilolpropano trimetacrilato (TMPT) e 1,4-butanediol dimetacrilato (1,4 - BDMA). Para a resina Metabase, foi observado que o líquido apresenta MMA, EHMA e 1,6 - HDMA. Os líquidos das resinas Kooliner e New Tru Liner possuem IBMA e, o New TruLiner, também apresenta o DBP. A análise do material Tokuso Rebase revelou a presença de

dois monômeros: o 1,6 - HDMA e outro não determinado, que pelos espectros de ressonância magnética obtidos parece ser o β -metacrilóil oxietil propionato.

Linha celular de queratinócitos humanos, RHEK-1, foi utilizada para avaliar a citotoxicidade do PB e seu produto de degradação AB, por Babich et al.⁴, em 1996. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste colorimétrico de vermelho neutro, onde foi analisado o valor de IC 50 (concentração inibitória de 50% das células), em mM, após 24h de contato dos compostos com as células. Os valores IC 50 foram 0,11 para PB e 29,5 mM para o AB. Citotoxicidade irreversível foi observada após 1h de contato com concentrações de PB maiores ou igual a 0,15 mM. Danos na membrana plasmática celular, como liberação de desidrogenase láctica, foram evidentes quando as células foram expostas ao PB em concentração de 0,05 mM por 4h. A membrana intracelular também foi afetada com extensa vacuolização, inicialmente perinuclear e, posteriormente, comprometendo todo o citoplasma. A geração de radicais livres pelo PB foi sugerida, pelos seguintes fatores: a quantidade intracelular de glutathione foi baixa nas células expostas ao PB; as células pré-tratadas com clorodinitrobenzeno, agente que reduz a quantidade de glutathione, foram hipersensíveis para os efeitos do PB; a peroxidação de lipídeos pelo PB foi induzida na presença de Fe²⁺; e as células previamente mantidas em meio contendo vitamina E e um antioxidante, foram mais resistentes ao PB, apresentaram menor peroxidação de lipídeos na presença de PB + Fe²⁺ e não desenvolveram extensa vacuolização intracelular quando comparadas com as células não tratadas com vitamina E.

Materiais reembasadores rígidos autopolimerizáveis são freqüentemente utilizados para promover melhora na estabilidade de próteses removíveis. Em 1996, Bohnenkamp⁷, descreveu um caso clínico de paciente com 56 anos, sexo masculino, que apresentou sinais e sintomas após

a realização de reembasamento imediato. O paciente relatou dificuldade no uso da prótese mandibular 24 horas após o procedimento ter sido realizado, devido à dor causada pela presença de ulcerações na cavidade bucal. O paciente apresentava-se febril e, no exame extra-oral, foi detectado linfadenopatia bilateral na palpação. No exame intra-oral, foram observadas ulcerações e edema em toda a área edêntula em contato com a prótese. O diagnóstico diferencial inicial incluiu estomatite por contato alérgico ou estomatite traumática causada pela exposição ao material reembasador autopolimerizável. A história médica e odontológica do paciente foi avaliada não tendo sido relatada alergia, especialmente a resinas acrílicas para base de prótese. O paciente informou que, para o reembasamento na prótese maxilar, apenas um procedimento foi necessário. Para o reembasamento da prótese mandibular, entretanto, foram realizados 3 procedimentos a fim de se conseguir uma boa adaptação da prótese. A geração de calor e a irritação química são as causas mais comuns de estomatite na mucosa dos pacientes. O tratamento incluiu a utilização de um analgésico, e aconselhamento ao paciente para utilizar a prótese apenas durante a alimentação. Após 10 dias, não foram mais observadas úlceras no tecido mole e o rebordo residual apresentava-se normal após 2 semanas. Os autores concluíram que a aplicação repetida de resinas acrílicas autopolimerizáveis para reembasamento pode resultar em estomatite traumática. Por essa razão, o reembasamento imediato deve ser cuidadosamente monitorado durante a polimerização. A estomatite traumática causada por materiais reembasadores rígidos pode ser diferenciada de outras doenças pela história prévia do paciente.

No ano seguinte, Sheridan et al.⁵³, em 1997, realizaram estudo para comparar a citotoxicidade de resinas polimerizadas por calor (Lucitone 199), ativada quimicamente (Lucitone de ativação química) e por energia de microondas (Acron MC), através da viabilidade

celular de fibroblastos gengivais humanos quando expostos aos eluatos obtidos com essas resinas, em períodos de 24, 42, 72 e 96h. Foram confeccionados 30 corpos-de-prova (12 mm X 1 mm) das resinas polimerizadas por microondas e calor, em condições assépticas. Vinte desses corpos foram selecionados, aleatoriamente, para serem utilizados neste estudo. Removidos os excessos de cada disco, realizou-se a limpeza com água destilada em ultrassom por 20min e luz ultravioleta, pelo mesmo período. Alguns discos não expostos a esse tratamento foram submetidos ao teste de citotoxicidade para demonstrar que a luz ultravioleta não interfere na polimerização das resinas. Os eluatos foram, então, preparados utilizando-se 5 discos para cada um dos tempos previamente determinados. Após esses períodos, os eluatos foram congelados a -20° C até a exposição aos fibroblastos humanos. Para o ensaio de citotoxicidade, células foram colocadas em uma placa de 96 orifícios em concentração de 3×10^4 por orifício, e incubadas por um período de 24h em 200 ml de alpha - meio essencial mínimo, suplementado com 100 mg/ml de penicilina G, 50 mg/ml de sulfato de gentamicina e 0,1% de soro fetal bovino. Após essa fase, o meio foi descartado e 200 ml de cada eluato armazenado foram adicionados. Meio de cultura sem eluato foi utilizado como controle negativo. Além disso, para permitir a obtenção de uma curva padrão, células em diferentes concentrações (5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5) foram também plaqueadas, com meio de cultura suplementado. A viabilidade celular foi avaliada por meio do teste de MTS, que é composto de um tetrazólio (MTS) e um agente acoplador de elétrons, o fenazine metossulfato (PMS). Os testes mostraram que todas as resinas, em todos os tempos, tiveram efeito significativo sobre os fibroblastos gengivais humanos. A resina Lucitone quimicamente ativada apresentou maior inibição na viabilidade celular quando comparada com as resinas Lucitone 199 e Acron MC. Os autores concluíram que todas as resinas testadas liberaram componentes tóxicos, tendo sido o eluato da resina quimicamente ativada mais tóxico quando

comparado com as das resinas ativadas por calor e microondas. Contudo, a resina polimerizada por microondas apresentou citotoxicidade significativamente maior que a resina termopolimerizável, no período de 96h.

Existem poucos estudos que relacionam a estrutura dos monômeros utilizados nos produtos odontológicos com a citotoxicidade. Dessa forma, Yoshii ⁶⁸, em 1997, realizou estudo com o objetivo de analisar a toxicidade de acrilatos e metacrilatos, usando testes de citotoxicidade, e correlacionar a estrutura dos materiais testados com a citotoxicidade. Foram selecionados 16 monoacrilatos e monometacrilatos que possuem grupamento éster alquílico (Metil acrilato – MAA; Etil acrilato - EAA; n-Propil acrilato – nPAA; n-Butil acrilato - nBAA; i-Butil acrilato - iBAA; Lauril acrilato - LAA; Metil metacrilato – MMA; Etil metacrilato – EMA; n-Propil metacrilato – nPMA; n-Butil metacrilato – nBMA; i-Butil metacrilato – iBMA; Lauril metacrilato – LMA) e éster alquílico com um grupo hidroxila (2-Hidroxil etil acrilato -HEAA; 2-Hidroxil etil metacrilato – HEMA; 2-Hidroxipropil acrilato - HPAA; 2-Hidroxipropil metacrilato - HPMA), 10 monometacrilatos com grupos funcionais (2-Metoxietil metacrilato - ME; 2-Etoxietil metacrilato - EE; 2- Butoxi etil metacrilato - BE; 2-Fenoxietil metacrilato - PE; Benzil metacrilato – BZ; 4- metacrilóiloxietil trimérico ácido anidratado - 4 META; 2-Etilbutil metacrilato – EB; tetrahidrofurfuril metacrilato – THF; Glicidil metacrilato - G; dimetilamoetil metacrilato – DMC; Cloreto de metila - sal) e 13 dimetacrilatos (Monoetileno glicol dimetacrilato - 1G; Dietileno glicol dimetacrilato - 2G; Trietileno glicol dimetacrilato – 3G; Tetraetileno glicol dimetacrilato - 4G; Nonaetileno glicol dimetacrilato - 9G; Tetradecaetilenoglicol dimetacrilato - 14G; Tricoaetilenoglicol dimetacrilato - 23G; 2,2-Bis [4-(2-hidroxi-3-metacrilóiloxipropil)fenil-]propano - Bis-GMA; Uretano dimetacrilato - UDMA; 1,6 - Hexanediol

dimetacrilato - HD; 2-Hidroxi-1,3-dimetilacrilóxi propano - HP; 1,3 - Butileno glicol dimetacrilato - BG; Neopentiglicol dimetacrilato - NPG). Os monômeros hidrofílicos foram dissolvidos direto no meio de cultura, com L-Glutamima (0,292 g/L). Monômeros hidrofóbicos (LAA, LMA, BE, PE, BZ, EB, bisGMA, UDMA, BG, NPG), entretanto, foram dissolvidos em tetraborato de polioxietileno sorbitano, com proporção de monômero e surfactante de 3:1. Foi utilizado o teste de MTT, com células HeLa S3, para avaliar a citotoxicidade. Curvas de dose-resposta foram confeccionadas para determinar a quantidade de cada monômero que diminuiu a produção de formazan, mensurada pelo teste MTT, em 50% (valor - IC₅₀). O logaritmo do coeficiente de partição de cada monômero entre n-octanol e água (log P), também foi calculado. Os monoacrilatos e monometacrilatos com grupamento éster alquílico exibiram efeito dose-dependente e a citotoxicidade indicada pelo IC₅₀ dos monoacrilatos foi LAA > iBAA, nBAA, nPAA > MAA > EAA. Para os 6 monometacrilatos, a ordem observada foi LMA > iBMA, nBMA > nPMA > EMA > MMA. Os resultados do IC₅₀ sugerem que quanto mais longa a cadeia alquílica, maior a citotoxicidade em ambos, acrilatos e metacrilatos. Foi observada correlação entre o IC₅₀ e o logP para os acrilatos ($r^2 = 0,950$) e metacrilatos ($r^2 = 0,718$). Para os acrilatos e metacrilatos com éster alquílico correspondentes, os valores de IC₅₀ para os acrilatos sempre foram menores que os dos metacrilatos. Os efeitos citotóxicos de 4 monômeros com o grupo hidroxila mostraram a mesma tendência observada naqueles com ésteres alquílicos, com os acrilatos apresentando maior citotoxicidade que os metacrilatos, tendo sido observada a seguinte ordem de citotoxicidade HEAA > HPAA > HEMA, HPMA. Todos os monômeros com grupo hidroxila mostraram menores valores de citotoxicidade quando comparados aos monômeros correspondentes com ésteres alquílicos sem grupo hidroxila. Nos 4 metilmetacrilatos com substituintes aos ésteres, a citotoxicidade foi a seguinte: PE > BE > EE > ME. Correlação foi

observada entre o IC_{50} e o $\log P$ em 4 etil metacrilatos com substituintes aos ésteres ($r^2 = 0,980$). Entretanto, para os monometacrilatos com outros grupos funcionais, os valores de IC_{50} apresentaram grande variação de 0,33 a 88,77 mmol/L e nenhuma relação entre o IC_{50} e o $\log P$ foi encontrada ($r^2 = 0,392$). A ordem de citotoxicidade foi à seguinte: EB, G, BZ > 4 META, THF > DMC. Para os 7 dimetacrilatos avaliados, que apresentavam diferentes comprimentos da cadeia de oxietileno, foi observado que aqueles que possuíam 14 cadeias de oxietileno ou menos apresentaram valores similares de IC_{50} variando de 1,06 a 1,97 mmol/L. Por outro lado, aqueles que apresentavam 23 cadeias de oxietileno os valores de IC_{50} foram muito maiores (10,28 mmol/L). A citotoxicidade desses monômeros apresentou a seguinte ordem: 1G, 2G, 3G, 4G, 9G, 14G > 23G. Para os outros 6 dimetacrilatos avaliados, o bis-GMA mostrou maior citotoxicidade, vindo a seguir o UDMA > NPG > HP, BG > HD. Todos os acrilatos foram mais tóxicos que os metacrilatos. Para os acrilatos e metacrilatos com substituintes ao alquílico, o efeito citotóxico aumentou com o aumento no comprimento da cadeia do substituinte ester e correlação inversa entre IC_{50} e $\log P$ foi encontrada. Os efeitos citotóxicos dos acrilatos e metacrilatos com substituintes ao alquílico foram afetados pelos seus valores de $\log P$. O $\log P$ de um monômero relaciona-se diretamente com sua lipofilicidade. Assim, a citotoxicidade desses monômeros é afetada por sua lipofilicidade, sugerindo que os efeitos citotóxicos são causados por meio da incorporação desses monômeros na superfície da camada lipídica das biomembranas ou pela solubilização dos lipídios dessas membranas pelos monômeros. Neste estudo, entretanto, foi observado que para os monometacrilatos com outros grupos funcionais, não houve correlação entre o IC_{50} e o $\log P$, sugerindo que outros fatores como carga elétrica foram dominantes. O monômero DMC apresentou o menor efeito citotóxico (IC_{50} de 88,77 mmol/L) devido a sua carga positiva quando em solução. O grupo hidroxila aumentou a citotoxicidade dos acrilatos e

metacrilatos. Dimetacrilatos com 14 cadeias de oxietileno ou menos apresentaram a mesma citotoxicidade, enquanto dimetacrilatos com 23 cadeias de oxietileno tiveram menor citotoxicidade.

Independentemente do método utilizado para iniciar a polimerização das resinas para base de próteses, a conversão dos monômeros em polímeros não é completa e algum monômero residual permanece nos polímeros. Acredita-se que a sensibilidade dos tecidos orais as resinas para base de prótese depende da quantidade de monômero residual. Dessa forma, Vallittu et al.⁶⁴, em 1998, realizaram um estudo para avaliar o efeito da temperatura e do tempo de polimerização no conteúdo de metacrilato de metila residual em duas resinas autopolimerizáveis, cuja reação de polimerização é iniciada pelo ácido barbitúrico (Palapress Vario e ProBase Cold) e duas termopolimerizáveis, iniciada pela ativação do peróxido de benzoíla (Lucitone 199 e ProBase Hot). Corpos-de-prova, na forma de discos (30 mm x 2 mm) foram confeccionados. Para as resinas autopolimerizáveis o tempo de polimerização foi constante (15min) e a temperatura variou de 30° a 60° C. Para as resinas termopolimerizáveis foram utilizados vários ciclos, incluindo 70 °C por 540min, 70 °C durante 90min, seguido de aquecimento a 100° C por 7 diferentes períodos de tempo (variando de 30 a 1.440min) e polimerização a 100° C por 11 diferentes períodos (entre 15 a 1.440min). Depois de polimerizados, os corpos-de-prova foram armazenados a 23 ± 1 °C com umidade relativa de $50 \pm 5\%$ por um período de 3 dias, sendo posteriormente desgastados e polidos até atingirem espessura de 1 ± 0.1 mm. A mensuração da quantidade de metacrilato de metila residual foi realizada por meio de cromatografia a gás. Os resultados mostraram que para as resinas autopolimerizáveis quanto maior a temperatura, menor a quantidade de monômero residual liberado. E, para as

termoativadas, as que foram polimerizadas a 100° C, apresentaram redução na quantidade de monômero residual com o aumento do tempo de polimerização. De forma geral, as resinas autopolimerizáveis apresentaram níveis de monômero residual maiores que as termopolimerizáveis. Quando submetidas a diferentes ciclos de polimerização, as resinas termopolimerizáveis apresentaram grande quantidade de metacrilato de metila residual na temperatura de 70° C por 540min. Esses resultados foram associados com o fato de que, nas resinas termopolimerizáveis, ocorre elevação da temperatura que pode atingir a temperatura de transição vítrea da matriz polimérica, proporcionando movimentos das cadeias moleculares, facilitando a polimerização do monômero. Assim, ciclos de aquecimento com temperaturas abaixo de 100° C, resultaram em polímeros com conteúdos de metacrilato de metila mais altos do que aqueles obtidos com períodos de polimerização a 100° C mais longos.

Tendo em vista a liberação de monômeros residuais e outros produtos a partir de resinas acrílicas para base de prótese, Kedjarune et al.²⁸, em 1999, avaliaram a concentração de MMA residual, assim como sua citotoxicidade, de três resinas autopolimerizáveis (Takilon, Tokuso e Meliodent) e três termopolimerizáveis (Rodex, Trevalon e Meliodent). Para a realização do estudo, foram confeccionados 15 corpos-de-prova (8 mm X 35 mm X 3 mm) de cada material, seguindo-se as instruções dos fabricantes. Dez corpos-de-prova foram utilizados para determinar a concentração de monômero residual, imediatamente após a confecção. Os outros 5 foram colocados em tubos contendo saliva para análise da liberação do MMA, verificada pelo método da cromatografia a gás, após períodos de imersão de 24 e 48h. Para o teste de citotoxicidade, foram utilizados fibroblastos humanos, obtidos de tecido gengival. Essas células foram colocadas em orifícios de placas, contendo meio de cultura. Após 24h, o meio de cultura

foi substituído por novo meio contendo as diferentes concentrações de metil metacrilato e a viabilidade celular foi analisada através do teste de citotoxicidade MTT. Os resultados demonstraram que a liberação de monômero não depende apenas do tipo de polimerização, mais também da proporção pó/líquido utilizada e do método de processamento. Quanto maior a quantidade de líquido, maior a quantidade de monômero residual. Assim como, quanto maior o tempo de polimerização, menor a quantidade de monômero residual. As resinas que apresentaram baixa quantidade de monômero residual, também apresentaram baixa liberação de MMA. Contudo, resinas que apresentaram alta concentração de monômero residual, não necessariamente apresentaram grande liberação de MMA. O teste MTT demonstrou que o MMA, em todas as concentrações liberadas a partir das resinas avaliadas, apresentou efeitos citotóxicos. Em geral, maior citotoxicidade foi observada para as maiores quantidades liberadas.

Tang et al.⁵⁷, em 1999, realizaram experimento para avaliar a citotoxicidade de resinas utilizando diferentes métodos de exposição das células aos materiais por meio dos testes MTT e ³H - timidina. Foram utilizados um cimento ósseo quimicamente polimerizável (CMW 1) à base de MMA e 5 materiais fotopolimerizáveis, sendo um selante de fissura (Concise) e dois materiais restauradores (Z100 e Silus Plus) à base de Bis-GMA/TEGDMA, uma resina ortodôntica para colagem de brackets (Transbond XT) contendo Bis-GMA e dimetacrilato e um adesivo dentinário (Scotchbond Multipurpose) à base de Bis-GMA e HEMA. As células utilizadas foram fibroblastos gengivais humanos e os testes foram realizados em placas com 24 orifícios, tendo sido colocados 20.000 células em 2 ml de meio por orifício. Vinte e quatro horas após, as amostras obtidas das resinas foram introduzidas no meio de cultura e as células avaliadas quanto aos efeitos citotóxicos. Corpos-de-prova (2 x 8 mm) de cada material foram confeccionados e

mantidos intactos ou submetidos à remoção da camada superficial de inibição pelo oxigênio com gaze estéril contendo acetona 99%. Os corpos-de-prova intactos foram avaliados em 4 diferentes experimentos: 1- corpos-de-prova colocados sobre as células; 2- células colocadas sobre os corpos-de-prova; 3- corpos-de-prova colocados sobre uma membrana com microporos acima das células (contato indireto células materiais); desse modo, as células entram em contato com as substâncias liberadas pelas resinas no meio de cultura; 4- eluatos obtidos a partir dos corpos-de-prova colocados no meio de cultura contendo as células. Os extratos foram obtidos pela imersão dos corpos-de-prova no meio de cultura durante 30min sob agitação em banho de água a 37° C. Os corpos-de-prova em que a camada superficial de inibição pelo oxigênio foi removida foram testados somente na condição experimental 3. Os testes MTT e ³H - timidina foram realizados nos períodos de 1, 3 e 6 dias após exposição das células às condições experimentais. Os resultados demonstraram a existência de diversos padrões de toxicidade material-dependente entre as resinas testadas. Um resultado observado em todos os procedimentos foi a citotoxicidade tardia de todas as resinas, demonstrado pelo teste de MTT. O cimento ósseo à base de MMA apresentou menor toxicidade nos dois testes (MTT e ³H - timidina) quando comparado com os materiais à base de Bis-GMA. As condições experimentais com diferentes tipos de contato entre as células e as resinas influenciaram significativamente os testes de citotoxicidade. O teste ³H - Timidina foi mais sensível à toxicidade das resinas que o MTT, que, por outro lado, é um método que produziu resultados mais reprodutíveis e pode trazer mais informações sobre a natureza da toxicidade. A remoção da camada superficial das resinas reduziu significativamente, mas não eliminou completamente, a toxicidade das resinas.

Apesar de já terem sido relatados diferentes graus de citotoxicidade das resinas acrílicas para base de prótese, à base de PMMA, os mecanismos de morte celular ainda não foram elucidados. Dois modos de morte celular têm sido descritos: apoptose e necrose, sendo que a apoptose é um modo ativo e fisiológico de morte celular, com integridade das organelas celulares e da membrana plasmática e ocorre na ausência de resposta inflamatória. Já a necrose é um processo passivo que ocorre após a exposição da célula à injúria, caracterizado por aumento de volume das mitocôndrias, ruptura da membrana plasmática e liberação dos constituintes citoplasmáticos, havendo, também, reação inflamatória no tecido. Dessa forma, Cimpan et al.⁹, em 2000, realizaram estudo com o objetivo de identificar e quantificar os modelos de morte celular induzida por substâncias liberadas por três resinas acrílicas termopolimerizáveis (Vertex RS - VRS; Superacryl – S; Superacryl “New” - SN) e quatro autopolimerizáveis (Vertex SC - VSC; Quick SR 3/60 type 10 - Q; Duracryl – D; Duracryl “New” - DN). Corpos-de-prova (50 mm X 0,5 mm) foram confeccionados e armazenados por 24 ou 48h a 37° C em meio de cultura para obtenção dos extratos. As médias entre massa do corpo-de-prova e volume do meio utilizadas foram de 0,1 g/ml, 0,2 g/ml, 0,4 g/ml e 0,8 g/ml. Para o contato extrato/células, $7,5 \times 10^5$ células U-937 (células de linfoma humano) foram colocadas em placas com o meio de cultura contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova e incubadas por 24 e 48h. Como controle negativo, foi utilizado cultura de células expostas ao meio de cultura e incubadas nas mesmas condições que as dos extratos. Após períodos de armazenamento, três testes foram utilizados para a análise da citotoxicidade: quantificação de DNA, microscopia óptica e eletrônica de transmissão e teste para quantificar a morte celular por apoptose ou necrose (teste Anexina V-FITC). Os resultados mostraram que os eluatos das resinas induziram a morte celular de maneira dependente da concentração e do tempo e de forma geral, as substâncias liberadas pelos corpos-

de-prova induziram, de maneira significativa, a morte celular em relação ao grupo controle. Na concentração do extrato de 0,1 g/ml, as resinas autopolimerizáveis Duracryl e Duracryl New induziram porcentagens de morte celular, por apoptose ou necrose, maiores que as resinas termopolimerizáveis. Nas concentrações de 0,2 g/ml e 0,4 g/ml não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as resinas. Na concentração de 0,8 g/ml, a morte por necrose superou a morte por apoptose das células em contato com os extratos das resinas Duracryl e Duracryl New. As substâncias liberadas por todas as resinas diminuíram a viabilidade das células em todos os intervalos de tempo utilizados, tendo sido observada maior morte celular quando em contato com extratos obtidos em 48h do que com aqueles obtidos em 24h, apesar de outros autores terem relatado maior citotoxicidade das resinas para base de prótese para os eluatos obtidos no período de 24h. Segundo os autores, essas diferenças nos resultados podem ter ocorrido devido a diferença na composição das resinas testadas, diferentes tipos de células e de ensaios empregados em cada estudo. Os autores consideraram importante a identificação do padrão de morte celular na avaliação da citotoxicidade. Se o material causa apoptose, os tecidos que estão em contato com a prótese terão maiores condições de se adaptar as modificações induzidas por ela. Por outro lado, se o material causar necrose, o fenômeno inflamatório resultante pode induzir reações teciduais mais severas. Os efeitos citotóxicos observados neste estudo foram atribuídos a possível peroxidação dos lipídeos celulares, que pode ser causado pelo PB presente na composição das resinas, ou por alterar os mecanismos de fosforilação.

A atividade estrogênica de compostos utilizados na odontologia foi estudada por Hashimoto et al.¹⁸, 2000, por meio de ensaio de gene e competição pelo receptor estrogênio. Dez compostos foram testados: bisfenol A - BPA; Bis-GMA; TEGDMA; MMA e HEMA; DBP,

BBP; n-butil ftalil n-butil glicolato - BPBG, di(2- etilhexil) ftalato - DEHP, di(2-etilhexil) adipato – DOA. Esses compostos foram diluídos com dimetil sulfóxido (DMSO) em faixas de concentração entre 5×10^{-7} à 5×10^{-3} M. Como controle positivo foi utilizado o 17β -estradiol (E2). BPA e BBP mostraram atividades estrogênicas nos dois testes, enquanto os demais compostos não apresentaram atividade nas concentrações testadas. Informações adicionais, associadas com experimentos in vivo e epidemiológico são necessários. Essas investigações podem promover informações sobre a validade dos métodos utilizados neste estudo para testar a atividade estrogênica de compostos.

Os metacrilatos são considerados como causa de dermatite alérgica de contato em profissionais da área odontológica, assim como de estomatite alérgica de contato e outras reações adversas da mucosa oral pelo uso de próteses. Entretanto, reações alérgicas sistêmicas são raras. Lunder, Rogl-Butina³⁸, em 2000, relataram um caso clínico de paciente do sexo feminino, 49 anos, que se apresentou com urticária durante uma semana. No questionário sobre a saúde, relatou problemas respiratórios (asma) e alergia a salicilato, e episódios curtos de urticária nos últimos anos, facilmente solucionados com o uso de anti-histamínico. Dessa forma, foram administrados anti-histamínicos via oral e os sintomas melhoraram gradativamente. A causa, entretanto, não foi diagnosticada. A paciente associou a urticária ao uso da prótese dentária, que havia sido instalada dois meses antes. Ao retirar a prótese por alguns dias o sintoma desapareceu, reincidindo com o uso da mesma. A paciente não apresentava alterações aparentes na mucosa e não relatou sensação de ardência ou queimação na cavidade bucal. Teste de contato foi realizado e o resultado demonstrou que a paciente apresentou reação positiva para o metil metacrilato e para o líquido da resina K30, utilizada na confecção da prótese. A paciente foi, então, orientada

para não utilizar a prótese e, como consequência, o sintoma não foi mais relatado. Após duas semanas, a prótese foi substituída por outra, confeccionada com um material que não continha metil metacrilato e a paciente não apresentou mais lesões.

No mesmo ano, Cimpan et al.¹⁰, em 2000, realizaram um estudo com o objetivo de determinar a capacidade de alguns polímeros para base de prótese, à base de PEMA de afetar a clonogenicidade e induzir a morte celular por necrose e/ou apoptose de fibroblastos de linhagem L929. Foram confeccionados corpos-de-prova (50 mm x 0,5 mm), em condições assépticas com as resinas termopolimerizáveis (Vertex RS, Superacryl e Superacryl New) e autopolimerizáveis (Vertex SC, Quick SR 3/60, Duracryl e Duracryl New). Imediatamente após a confecção, os corpos-de-prova foram colocados em placas, com meio de cultura e incubados por 24 ou 48h a 37° C para a obtenção dos extratos. As médias entre massa de corpo-de-prova e volume de meio de cultura foram de 0,2 g/ml, 0,4 g/ml e 0,8 g/ml. Como grupo controle negativo foi utilizado meio de cultura, incubado sob as mesmas condições, porém sem amostras de resinas. Os efeitos das substâncias testadas foram avaliados por meio de diferentes métodos. Para o método de contagem de colônias, as células L 929 foram propagadas sobre os discos de resina imersos em meio de cultura ou em contato com os extratos previamente obtidos, tendo sido incubadas por 10 dias. As colônias foram, então, fixadas, coradas e contadas. Testes similares, porém com tempo de incubação menor (24 e 48h), também foram realizados e as células coradas com iodeto de propídio para marcação do DNA. Esses testes foram realizados para avaliar se as resinas afetam a clonogenicidade das células (colônias) e induzem a morte celular por apoptose (marcação do DNA) e se esses efeitos são causados por contato direto com os materiais ou por meio das substâncias por eles liberadas. Para a realização do teste com Annexina V-FITC, as células L 929

foram propagadas em placas de 24 orifícios em contato com os extratos obtidos, incubadas por 24 e 48h , marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídio, para verificar a redução do DNA das células mortas por apoptose. As células foram, então, analisadas em microscópio confocal a laser. As células aderidas nos corpos-de-prova e as que cresceram em contato com os extratos obtidos foram fixadas para análise em microscopia eletrônica. Por meio da contagem de colônia, os resultados mostraram que quanto maior a média entre a massa do corpo-de-prova e o volume do meio, maior foi a citotoxicidade do material testado, tendo sido as resinas autopolimerizáveis mais tóxicas dos que as termopolimerizáveis. Além disso, observou-se que o contato direto entre as células e os discos de resina provoca maior redução do número de colônias. Na média de 0,8 g/ml, observou-se maior número de morte celular por apoptose ou por necrose em relação às outras proporções utilizadas. Para todas as resinas acrílicas testadas e em todas as proporções utilizadas foi verificado maior número de morte celular por apoptose em relação aos outros padrões (necrose secundária e necrose), fato confirmado pelas análises microscópicas. A porcentagem de células necróticas aumentou com o aumento da proporção massa do corpo-de-prova e o volume do meio, tendo sido maior nas concentrações de 0,4 g/mL e 0,8 g/mL. Esses resultados sugerem que reações mais severas dos tecidos podem ocorrer em concentrações mais altas. Em todos os testes realizados, os efeitos citotóxicos foram mais acentuados quando do contato direto das células L929 com as resinas. Uma possível explicação seria que o efeito tóxico das substâncias liberadas é mais forte quando as células são expostas a essas substâncias durante sua liberação. O potencial citotóxico dos eluatos pode diminuir com o tempo devido à degradação progressiva ou reações das substâncias liberadas com outros componentes químicos presentes no meio de cultura. Os efeitos tóxicos observados, segundo os autores, podem estar relacionados com a liberação de peróxido de benzoila e metil metacrilato que podem causar

peroxidação dos lipídeos celulares e bloqueio do transporte de elétrons. Tem sido observado que existe mais monômero residual nas resinas autopolimerizáveis e que a indução da polimerização por calor aumenta a quebra do peróxido de benzoila. Esses aspectos podem diminuir a liberação desses componentes a partir de resinas termopolimerizáveis e podem ajudar a explicar porque, em geral, as resinas autopolimerizáveis apresentaram efeitos citotóxicos mais acentuados. Entretanto, os autores enfatizaram que, somente as condições de polimerização, não são suficientes para explicar os resultados, considerando-se que uma das resinas autopolimerizáveis (Vertex SC) apresentou menor efeito tóxico que a resina termopolimerizável Superacryl. Além disso, apesar da resina Vertex RS ter sido polimerizada por tempo muito mais curto que as resinas Superacryl e Superacryl New, apresentou menor potencial de indução de morte celular. Assim, para determinar as causas dessas diferenças, a composição química e os componentes que são liberados de cada material devem ser identificados e o potencial citotóxico de cada componente deve ser analisado.

Silikas, Watts⁵⁴, em 2000, objetivaram analisar a composição de primers e agentes de união para dentina, e investigar a relação entre o tempo de retenção desses compostos em análises de HPLC e o valor do coeficiente de partição (Log P). Os valores de log P foram obtidos de forma computacional, através de um software. Os resultados dos agentes de união à dentina foram analisados e os monômeros identificados. Os valores de Log P foram calculados e relacionados com os tempos de retenção dos monômeros através da seguinte equação: $\log P = 2.436R(t) - 3.636$ e, o valor obtido de (r) foi igual a 0,9095. Assim, os autores sugeriram que esses valores podem ser utilizados como uma ferramenta de previsão em análises futuras.

Lefebvre et al.³⁷, em 2001, realizaram estudo do efeito da incorporação de um agente anti-microbiano (Microban) em um reembasador macio (PermaSoft) sobre a aderência de *Candida albicans* na parte externa e interna do material, bem como na citotoxicidade. Os ftalatos presentes nos materiais reembasadores podem ter efeitos citotóxicos sobre células de mamíferos. Considerando que esse aspecto poderia interferir com os resultados de toxicidade do Microban, corpos-de-prova foram confeccionados e imersos em saliva artificial estéril por 5 dias para permitir a liberação dos ftalatos e assegurar condições de longo prazo mais clinicamente relevantes. Para o teste de citotoxicidade, foram cultivados fibroblastos de rato Balb/c em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e antibióticos e a cultura foi mantida a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar. As células foram colocadas em placa de cultura de 24 orifícios, e corpos-de-prova (5 mm x 1 mm) sem o agente antimicrobiano (n=6) e com o produto Microban (n=6) foram colocados em contato com as células e incubados por um período de 48h. Os controles consistiram de orifícios contendo somente células e orifícios contendo células e discos de Teflon de mesmo tamanho que os do material Permasoft. Após o período de incubação, foi realizado o teste de MTT que reflete a função mitocondrial e a produção celular de energia. Para analisar o crescimento de *Candida albicans* na parte externa e interna do material, foram colocados corpos-de-prova com e sem o agente antimicrobiano em meio de cultura de ágar saboraud contendo o microorganismo. Após período de 24h, os discos foram lavados e centrifugados para liberar as células aderidas. As suspensões obtidas foram diluídas e plaqueadas em cultura de ágar saboraud e incubadas por mais 24 e 48h. Após estes períodos, as colônias formadas foram contadas. Os resultados mostraram que a adição do agente antimicrobiano ao PermaSoft não alterou a citotoxicidade do material e não reduziu a aderência de *Candida*

albicans na superfície (parte externa) do material. Com relação à parte interna, nenhum microorganismo foi encontrado no material, com ou sem o agente antimicrobiano.

No mesmo ano, Mainwaring et al.⁴¹, em 2001, analisaram possíveis lesões no epitélio olfatório de ratos causadas por metacrilato de metila. Ratos F344 foram expostos a 200 ppm de metacrilato de metila por 6h e desenvolveram uma lesão no epitélio oral olfatório que foi caracterizada por degeneração e atrofia. A severidade da lesão foi marcadamente reduzida pelo pré-tratamento dos ratos com uma dose intraperitoneal de p-nitrofenil fosfato, um inibidor da enzima carboxilesterase. Esse resultado demonstrou que a lesão foi causada pelo metabolismo do metil metacrilato em ácido metacrílico, que é um metabólito irritante e corrosivo. Esse metabolismo é mediado pela carboxilesterase. A distribuição dessas enzimas no tecido nasal foi investigada e o metabolismo do metacrilato de metila para ácido metacrílico foi comparado em ratos, hamsters e tecido nasal humano in vitro. Análise histo-citoquímica mostrou que as carboxilesterases apresentaram-se fortemente localizadas em células e na região das glândulas olfatórias do rato, mas geralmente foram mais distribuídas no epitélio olfativo humano. Coerente com isso, a atividade enzimática, nas três espécimes, foi maior no tecido olfatório quando comparado com o respiratório. Esses resultados sugeriram que as células nasais humanas são significativamente menos sensíveis à toxicidade do metil metacrilato, quando comparadas com as células de ratos.

Diversos tipos de materiais poliméricos têm sido introduzidos no mercado como materiais para o reembasamento de bases de próteses. Os materiais atualmente disponíveis contêm uma variedade de monômeros metacrilatos e polímeros, em substituição ao MMA e PMMA com o objetivo de controlar o tempo e a temperatura de reação, diminuindo a irritação na

mucosa oral. Vários estudos *in vitro* foram realizados para averiguar as propriedades desses materiais, contudo, existem poucos relatos de estudos clínicos. Tendo em visto o exposto, Matsumura et al.⁴², em 2001, realizaram um estudo clínico com o objetivo de avaliar o comportamento de um material reembasador quimicamente polimerizável logo após sua polimerização e após um ano de utilização clínica. Foram selecionados 50 pacientes, que tiveram suas próteses reembasadas com o material reembasador autopolimerizável Tokuso Rebase que contém PEMA no pó e β -metacrilóil oxietil proprionato (39,8%) e 1,6-HDMA (60,2%) no líquido. Após o reembasamento, as próteses foram imersas em um agente para aumentar a dureza de superfície (Tokuso Resin Hardener-II) a 45° C durante 5min sendo, posteriormente, realizado o polimento do material. Foi realizado então, por dois examinadores, separadamente, 2 avaliações, sendo a primeira logo após o reembasamento da prótese e a segunda um ano depois. As avaliações abordaram os seguintes aspectos: (1) manchamento da superfície da base da prótese e do material reembasador; (2) alteração de cor dos dois materiais; (3) falha na união entre os dois materiais ou fratura; (4) adaptação; (5) irritação da mucosa oral. Os resultados mostraram que, na avaliação após um ano houve manchamento e alteração de cor em 5 próteses, falha na união do material reembasador e a resina de base em 3 casos e falta de adaptação em 2 próteses. Segundo os autores, um fator que pode afetar a estabilidade de cor é a baixa conversão do monômero. Assim, métodos para melhorar essa conversão como tratamentos pós-polimerização, utilização de agentes para aumentar a dureza de superfície ou inibir a ação do oxigênio são importantes para a aplicação clínica ideal desses materiais reembasadores. Irritação do tecido oral foi verificada em apenas um caso, na primeira avaliação, logo após a colocação do material. Os autores consideraram que esse resultado poderia estar vinculado ao fato do componente do líquido do material Tokuso ser menos volátil que o MMA e do aumento de

temperatura durante a polimerização ser menor que aquele observado em outras resinas quimicamente polimerizadas.

Testes de citotoxicidade têm sido largamente utilizados para avaliar as substâncias liberadas a partir de materiais para base de prótese. Contudo, existem poucos estudos comparando diferentes linhagens de células em relação a esses materiais. Dessa forma, Huang et al.²¹, em 2001, avaliaram, *in vitro*, a citotoxicidade de três materiais para base de prótese (polimerizado por calor - Lucitone 199; autopolimerizável - Rebase; fotopolimerizável - Triad), e compararam as respostas de duas linhagens de células (epitélio oral humano de linhagem KB ATCC CCL-17 e fibroblastos primários derivados da mucosa oral obtidos de tecido de biópsia de terceiro molar). Foram confeccionados três discos (2 mm x 7 mm x 35 mm), de forma asséptica, para cada material a ser testado, que foram imediatamente colocados em tubos contendo meio de cultura sem soro fetal bovino por 1, 3 e 5 dias. Os eluatos foram testados após o cultivo das células por 24h em meio de cultura, suplementado com soro fetal bovino e antibiótico, a temperatura de 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar. Para o teste de MTT, as células foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁴ células/orifício em placas de 96 orifícios. Após incubação, 50 µL de solução de MTT (1 mg/mL em solução tamponada salina) foram adicionados e as placas incubadas por mais 4h a 37° C. Para cada orifício, 150 µL de dimetil sulfóxido foram acrescentados. Os resultados do teste MTT foram mensurados no espectrofotômetro a 570 e 650 nm. Foram realizadas 5 duplicatas para cada teste. Os resultados mostraram que os eluatos foram tóxicos para todos os tempos e nas duas linhagens de células. A ordem de citotoxicidade das resinas foi: autopolimerizável > polimerizável por calor > fotopolimerizável, e a linhagem KB mostrou-se ligeiramente mais sensível ao teste que a de

fibroblastos orais humanos. Dessa forma, os autores concluíram que as duas linhagens de células podem ser utilizadas para testes *in vitro*, para se avaliar a citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese.

Kim et al.²⁹, em 2002, examinaram o efeito do DBP e seu metabólito mono-n-butil ftalato (MBuP) na citotoxicidade e diferenciação celular em cultura de células embrionárias de ratos. As células foram extraídas de ratos, com gestação de 12,5 dias, e expostas ao DBP ou MBuP por 96h, para verificar a citotoxicidade e inibição da diferenciação celular. Para os dois testes, foram encontrados efeitos concentração-dependente. Entretanto, MBuP apresentou efeito citotóxico em concentrações maiores que o DBP. Os valores de IC₅₀ do DBP (avaliados pelo ensaio colorimétrico de vermelho neutro) e diferenciação celular (mensurado pelo método colorimétrico azul de alcian) foram 25,54 µ/ml (91,75 µM) e 21,21 µ/ml (76,20 µM), respectivamente. Os valores de IC₅₀ do MBuP para citotoxicidade e diferenciação celular foram 307,24 µ/ml (1,38 mM) e 142,61 µ/ml (0,64 mM), respectivamente. Para determinar se radicais livres estariam relacionados com a indução da citotoxicidade e inibição da diferenciação do DBP nessas células, DBP foi co-administrado com vários antioxidantes, incluindo catalase e acetato de vitamina E. Essas substâncias diminuíram o efeito citotóxico e a inibição da diferenciação por DBP nas células testadas. Entretanto, esses compostos não mostraram efeito de proteção contra o MBuP. Os resultados indicaram que DBP e MBuP induziram efeitos citotóxicos nas células embrionárias de ratos e sugeriram que esse efeito pode ser exercido através de estresse oxidativo e pode estar relacionado com a relativa alta polaridade do MBuP em relação ao DBP.

Células de linhagem contínuas como 3T3 e fibroblastos de hamster L929 são freqüentemente utilizados em testes de citotoxicidade de materiais odontológicos por causa de

sua reprodutibilidade e respostas biológicas. Células de linhagem primária, apesar de representarem uma situação clínica mais próxima, apresentam desvantagens práticas, como: tempo para isolar a célula dos tecidos e necessidade de laboratório no momento da coleta, apresentam poucas células quando cultivadas e, a desvantagem mais importante, é que elas apresentam tempo de vida curto. A sensibilidade de diferentes linhagens celulares, entretanto, frente aos compósitos dentais, ainda não havia sido investigada. Assim, Thonemann et al.⁵⁸, em 2002, realizaram estudo para comparar a resposta de três linhagens de células (primárias de papila bovina, imortalizadas derivadas desta linhagem primária, transformada com antígeno-T e E6/F7 oncogen e L929 de hamster de linhagem imortalizada) a monômeros utilizados em materiais odontológicos. Para a realização do experimento, foram cultivadas células primárias de papila bovina (CCP) que, posteriormente, foram transformadas em células tCPC B e tCPC E. Essas células e as L929 foram cultivadas em meio de cultura contendo soro fetal bovino e antibióticos até a primeira passagem e, posteriormente, incubadas em meio de cultura com 10% de dimetil sulfoxido em nitrogênio líquido até serem utilizadas. Os compostos testados foram: BisGMA, UDMA, TEGDMA, 1,6 - HDMA (monômeros bifuncionais); BPA, glicidil metacrilato - GMA (precursores); MMA, HEMA (monômeros monofuncionais) e canforoquinona - CQ (fotoiniciador). Todos os compostos foram diluídos em 1 mol/l com dimetil sulfoxido e, para o teste de MTT, foram realizadas diluições seriadas contendo no máximo 1% de dimetil sulfoxido em cada concentração. Os resultados de citotoxicidade mostraram que os monômeros bifuncionais foram mais citotóxicos que os monofuncionais metacrilatos. Dentre as células avaliadas, a sensibilidade aumentou na seguinte ordem: CCP=tCPC B < tCPC E < L929. Dessa forma, as células de linhagem imortalizada L929 mostraram-se mais sensíveis que as das

linhagens primária e transformada de papila dental bovina, quando utilizadas em testes de biocompatibilidade de monômeros dentais.

Jorge et al.²⁵, em 2003, realizaram uma revisão da literatura de artigos publicados entre os anos 1973 e 2000, no banco de dados Medline, sobre a citotoxicidade de resinas acrílicas para base de próteses comparando diferentes tipos de resinas, métodos e ciclos de polimerização, além de fatores que podem influenciar na citotoxicidade. Dois fatores que podem influenciar na citotoxicidade desses materiais foram relatados: a proporção pó/líquido e o armazenamento das amostras de resina em água, sendo este último recomendado por 24h antes de instalar a prótese no paciente, por ser este o período de maior citotoxicidade em todas as resinas. E, quanto ao ciclo de polimerização utilizado, os estudos relatam que a quantidade de monômero residual, bem como a citotoxicidade, pode ser diminuída com o ciclo de 7h a 70° C seguido de 1h a 100° C. Por outro lado, o ciclo de 7h a 60° C e 5min a 90° C, caracteriza-se por ser o ciclo de maior liberação de monômero residual. Com relação aos métodos de polimerização, as resinas autopolimerizáveis são mais citotóxicas do que as termopolimerizáveis, que são mais citotóxicas do que as polimerizadas por meio de microondas.

O PB, um agente etiológico de tumor, pode liberar radicais livres que induzem peroxidação de lipídeos e danos nas membranas celulares em concentrações tóxicas. Entretanto, o efeito no metabolismo de lipídeos em concentrações não tóxicas foi investigado por Datar et al.¹³, 2004. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do PB e seu produto final de degradação, AB, no metabolismo de lipídeos. Duas linhagens celulares, células da mucosa oral de hamster (MOH) e monócitos humanos (THP-1), foram utilizadas para determinar o efeito do PB, AB e PB combinado com FeCl₂ no metabolismo de lipídeos. As células foram expostas ao PB e ¹⁴C

acetato por 24h e os lipídeos extraídos e separados com o uso de cromatografia. O metabolismo de alguns lipídeos neutros como o triglicerídeo foi alterado nas duas linhagens celulares em contato com o PB. O colesterol foi reduzido nas células THP-1 e o fosfolípídeo fosfatidiletanolamina (FE) foi reduzido nas células MOH. O AB, produto final do PB, não apresentou nenhum efeito sobre o metabolismo celular. Concentrações subtóxicas do PB induziram alterações nos lipídeos neutros como os triglicerídeos e colesterol. O metabolismo dos principais fosfolípídeos, exceto FE, manteve-se inalterado. Assim, os autores concluíram que os efeitos foram relacionados com o PB e seus produtos de degradação e variaram com o tipo celular.

Lai et al.³¹, em 2004, avaliaram a citotoxicidade dos líquidos de três resinas autopolimerizáveis (Alike, Kooliner e Tokuso Rebase) e dos principais componentes desses líquidos (MMA, IBMA e 1,6 - HDMA). As concentrações desses monômeros presentes nos líquidos das três resinas foram determinadas utilizando-se HPLC. Para o teste de citotoxicidade, foram obtidos fibroblastos gengivais (FG) humanos primários e células de ligamento periodontal (LP). Os líquidos das resinas e seus principais componentes foram dissolvidos em DMSO e diluídos em meio de cultura, sendo o DMSO utilizado na solução em concentração máxima < 0,5%. As células foram expostas a diferentes concentrações dos líquidos das três resinas e dos seus principais componentes a 37° C por 24h. O grupo controle foi submetido a apenas DMEM ou DMEM contendo 0,5% de DMSO. O ensaio de MTT, que mensura a atividade metabólica celular, foi realizado e a viabilidade celular avaliada. Além disso, os padrões de morte celular foram analisados usando a técnica da Anexina V - FITC (isotiocianato de fluoresceína/ iodeto de propídeo). As análises em HPLC mostraram que no líquido do material Alike o monômero

encontrado em maior quantidade foi o MMA (91,3%). O líquido do material Kooliner apresentou 94,5% de IBMA, enquanto para o líquido do Tokuso Rebase, a concentração do agente de ligação cruzada 1,6 - HDMA obtida foi de 65,8%. No teste de MTT, todos os monômeros foram citotóxicos, sendo o líquido do Tokuso Rebase o que apresentou maior citotoxicidade, tanto nas FG quanto nas LP. Aproximadamente 50% da viabilidade celular foi afetada quando 1,2% de MMA, 0,15% de IBMA ou 0,025% de 1,6 - HDMA foram utilizados. Os autores relataram que o maior tempo de retenção do 1,6 - HDMA, durante as análises em HPLC, pode ser indicativo que esse monômero apresenta um coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) mais alto. Esse $\log P$ é diretamente relacionado com a lipofilicidade, sugerindo que o mecanismo de ação dos monômeros é mediado pela membrana e é relativamente não específico. A maior parte das células morreu por necrose celular e somente uma pequena parte por apoptose. Com base nos resultados, os autores recomendam que o reembasamento imediato, no qual os materiais polimerizam *in situ*, deve ser utilizado com cuidado.

Sofou et al.⁵⁵, 2005, através do método de HPLC, analisaram a liberação de três compostos não-ftalatos (ácido metacrílico, metil metacrilato e n-butil metacrilato) e quatro ftalatos (dialil ftalato, butoxi carbonil metil butil ftalato, dibutil ftalato e dioctil ftalato), em três resinas acrílicas para base de prótese termopolimerizáveis (Triplex, Paladon 65 e Type 15). Corpos-de-prova foram confeccionados para cada um dos materiais avaliados e armazenados em três diferentes condições experimentais: água destilada, saliva artificial e uma mistura de etanol/água. Os líquidos provenientes das amostras, de todas as resinas avaliadas, foram analisados pelo HPLC, em três diferentes experimentos, para cada uma das condições experimentais em cada um dos parâmetros a serem verificados (tempo e temperatura). Os

resultados obtidos no presente estudo sugeriram que amplo espectro de monômeros residuais foi liberado pelas três resinas testadas. Os compostos não-ftalatos foram liberados em grandes concentrações. Os ftalatos examinados exibiram diferentes graus de liberação proporcional ao tempo de armazenagem, marca do material e tipo do experimento. Pôde-se observar que, quantidades significativas de compostos ftalatos e não-ftalatos foram liberadas pelas resinas testadas. O principal componente detectado foi o metil metacrilato, e o nível liberado foi tempo-dependente, diminuindo até o período de 5 dias, quando as resinas foram armazenadas em água destilada a temperatura ambiente.

Os monômeros podem ser liberados por materiais restauradores, difundir para a polpa ou gengiva e atingir a saliva e a circulação sanguínea. Além disso, o potencial genotóxico de alguns compostos utilizados na odontologia tem sido claramente documentado. Assim, Schwengberg et al.⁵¹, em 2005, realizaram estudo utilizando teste de fluorescência modificado com células embrionárias de rato (R.E.Tox) para avaliar o potencial embriotóxico dos seguintes compostos: BisGMA, UDMA, HEMA e TEGDMA, assim como de seus metabólitos intermediários, 2,3-epoxi-2-metil-ácido propiônico metil éster (EMPME), 1,2-epoxi-2-ácido metilpropiônico (EMPA) e AM. Células embrionárias de ratos (ER), transfectadas com vetor contendo o gene para a proteína de fluorescência verde, sob o controle do promotor da alfa-miosina cardíaca, foram diferenciadas na presença de diferentes concentrações dos compostos testados por 12 dias. A fluorescência foi mensurada utilizando o espectrofotômetro TECAN e valores foram expressos em porcentagem em relação aos valores controle. Para distinguir entre efeito citotóxico e embriotóxico, todos os compostos também foram testados pelo teste de MTT. Os compostos HEMA, TEGDMA e EMPME não influenciaram o processo de diferenciação das células ER em

miócitos cardíacos. Nenhum efeito citotóxico foi observado em nenhuma das concentrações testadas. A exposição ao BisGMA resultou em inibição de 50% da viabilidade celular e uma intensa inibição da diferenciação celular em 10^{-5} M. Efeitos embriotóxicos foram verificados nas concentrações 10^{-6} e 10^{-5} M. EMPA induziu diminuição na diferenciação das células ER na concentração 10^{-5} M sem efeitos citotóxicos. Nenhum efeito embriotóxico foi induzido em baixas concentrações. Exposição ao UDMA resultou em leve diminuição da diferenciação celular em 10^{-5} M. A exposição das células ao AM resultou em aumento da diferenciação cardíaca em até 150% em 10^{-5} M. Nenhum efeito citotóxico foi observado nas células após exposição ao AM no teste MTT. Os autores concluíram que, o BisGMA induziu efeito embriotóxico/teratogênico significativo em ampla faixa de concentrações. Dessa forma, atenção especial deve ser dada a este composto, o qual deveria ser melhor investigado em experimentos in vivo.

Para avaliar a possibilidade de existir correlação entre citotoxicidade e a mobilização de Ca^{2+} por (metil) acrilatos, Atsumi et al.³, em 2006, investigaram a viabilidade celular e a alteração na quantidade de Ca^{2+} em células de carcinoma de glândulas salivares (CGS) e fibroblastos gengivais humanos (FGH), tratadas, separadamente, com 9 monômeros (metil) acrilatos utilizados na odontologia. Foram avaliados monômeros com diferentes graus de hidrofobicidade: ácido acrílico (AA), AM, HEMA, MMA, *n*-butil acrilato (BA), IBMA, *n*-hexil metacrilato (HMA) e *n*-dodecyl metacrilato (DMA). A viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT, e a alteração no Ca^{2+} avaliada com células carregadas com indo-1/AM, um indicador fluorescente do cálcio intracelular. Para ambas as células CGS e FGH, a citotoxicidade dos monômeros foi aproximadamente proporcional à sua hidrofobicidade (log P). Nenhum aumento no de Ca^{2+} foi associado aos monômeros hidrofílicos. A elevação de Ca^{2+} por

monômeros hidrofóbicos ocorreu de forma dose/hidrofóbica dependente. A alteração de Ca^{2+} nas células CGS ocorreu em dois picos: um pico inicial acentuado seguido de um tardio mais amplo; com as células FGH, entretanto, apenas um único pico foi observado, possivelmente dependente da qualidade de membrana celular. O pré-tratamento com *n*-butanol ou com metil metacrilato aumentou a elevação de Ca^{2+} induzida pelo butil metacrilato, sugerindo que essa elevação possa ser relacionada com a hidrofobicidade dos monômeros e o tipo celular. Com os monômeros hidrofílicos, AA, AM e HEMA, a viabilidade celular dos dois tipos de células avaliadas não foi significativamente diferente daquela observada para o grupo controle (sem adição de monômeros). Por outro lado, os monômeros hidrofóbicos foram classificados em 3 sub-grupos: 1) DMA e HMA, que são altamente hidrofóbicos (log P maior que 3,5), causaram acentuada diminuição na viabilidade celular nas concentrações entre 1 a 10 μM . 2) BMA, IBMA e BA, que contêm o butil substituinte, são moderadamente hidrofóbicos (log P: 1,8 a 2,3) e reduziram a viabilidade celular nas concentrações entre 10 a 100 μM . 3) MMA que causou pequena redução na viabilidade celular na concentração de 1 mM.

Nos materiais reembasadores rígidos autopolimerizáveis, que permitem realizar o reembasamento das próteses diretamente na cavidade bucal do paciente, a conversão de monômero em polímero pode não ser completa. O monômero residual e outros componentes podem ser liberados na cavidade oral, resultando em reações teciduais. Assim, métodos de pós-polimerização vêm sendo sugeridos para promover maior conversão de monômeros em polímeros, com menor liberação de substâncias na cavidade oral. Dessa forma, Campanha et al.⁸, em 2006, realizaram um estudo para comparar a citotoxicidade de seis materiais reembasadores (TR, U, D, K, NT e Light Liner - LL), tendo sido este último material avaliado com e sem o

agente inibidor de oxigênio (LLABC). Os corpos-de-prova (10 mm X 1 mm) de cada material foram divididos em três grupos (n=3): G1 - sem tratamento de pós-polimerização; G2 - com tratamento por irradiação com energia de microondas; G3 - com tratamento por imersão em água aquecida (55° C por 10min). Os eluatos foram preparados colocando-se 3 discos em cada tubo estéril, contendo meio de cultura, suplementado com soro fetal bovino e antibiótico, e incubados por 37° C por 24h. Meio de cultura sem disco foi incubado para servir como controle negativo. Células L 929 foram colocadas nos orifícios de uma placa de cultura, incubadas por 24h (37° C em atmosfera de 5% de CO₂), quando, então, o meio foi substituído por meio contendo eluato, na proporção de 1:1, ou meio controle, e as células foram incubadas por mais 24h. Após esse período, a citotoxicidade foi avaliada por meio da viabilidade celular (MTT) e da incorporação do radioisótopo ³H - timidina. Houve inibição significativa da resposta celular para os eluatos obtidos dos materiais U e D no grupo 1. Além disso, houve inibição significativa da síntese de DNA em células expostas aos eluatos do grupo 3 para as resinas TR, D, NT e LLABC e aos eluatos do grupo 2 para os materiais K, D, NT, LL e LLABC. No teste de MTT, a citotoxicidade foi dependente do tipo de resina e os eluatos dos materiais NT, LL e LLABC produziram diminuição significativa na viabilidade celular comparado com o grupo controle. Para o ensaio com ³H - timidina, os tratamentos de pós-polimerização diminuíram a citotoxicidade do material U e não influenciaram o material D. Além disso, o tratamento pós-polimerização com microondas aumentou a toxicidade dos materiais K, NT, LL e LLABC e o tratamento com imersão em água aquecida aumentou a toxicidade das resinas TR, NT e LLABC. Esses resultados não eram esperados, tendo em vista que os tratamentos utilizados podem reduzir a quantidade de monômero residual. Assim, os resultados foram atribuídos a possível liberação de outras substâncias como aditivos e produtos da reação de polimerização, assim como formaldeído que

pode ser formado na camada superficial durante os tratamentos pós-polimerização. Um outro aspecto observado foi que, as resinas que proporcionaram menor atividade metabólica, nem sempre resultaram em baixa incorporação do radioisótopo demonstrando que a resposta das células L929 difere quando avaliada pelo teste MTT ou ³H-Timidina.

Dahl et al.¹¹, em 2006, realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de verificar a biocompatibilidade de 11 materiais reembasadores para base de prótese, sendo um autopolimerizável (Tokuso Rebase), cinco com polimerização dual (Astron LC Soft, Astron LC Hard, Bosworth Lightliner Soft, Bosworth Lightliner Hard, Triad DuaLine) e cinco fotopolimerizáveis (Lightdon U, Lightdon U + Plaquit, Triad Hi-Flow Reline Material, Triad Resiline Reline Material, Triad VLC Reline Material). Esses materiais foram avaliados através do teste de filtro Millipore, teste de viabilidade celular (MTT) e teste em membrana corion-alantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM). Para os testes MTT e HET-CAM, foram preparadas amostras dos materiais a partir das quais foram obtidos os extratos. No teste MTT, a citotoxicidade dos materiais foi determinada pela comparação entre a viabilidade celular (fibroblastos de hamster – L 929) obtida com os extratos em relação ao controle (meio de cultura sem extrato). A citotoxicidade no teste HET-CAM foi avaliada pelo grau de irritação da membrana corion-alantóide. Para o teste de filtro Millipore, filtros foram colocados na parte inferior dos orifícios da placa de cultura, sendo então cobertos com células L929 em suspensão. Os filtros foram colocados em meio de ágar com a parte correspondente às células voltadas para baixo. A seguir, sobre os filtros foram colocadas as amostras dos materiais polimerizados, em forma circular (5 mm de diâmetro), e as placas foram incubadas por 24h. Para os produtos que apresentaram citotoxicidade nas primeiras 24h foi realizado novo teste utilizando 2h de

incubação. A citotoxicidade dos materiais foi avaliada com base em um sistema de pontuação, que levou em conta a intensidade da coloração da área de contato entre a amostra e o filtro contendo as células e o diâmetro ou extensão da área afetada. Os resultados mostraram que, no teste de filtro Millipore, 5 dos 11 materiais testados foram ligeiramente ou moderadamente citotóxicos, enquanto Lightdon U, quando utilizado com o verniz Plaquit, foi severamente citotóxico. Além disso, todos os materiais apresentaram maior citotoxicidade após 24h de incubação, quando comparados ao período de 2h. No ensaio de MTT, apenas os materiais Triad Hi-Flow e Astron LC Hard não apresentaram citotoxicidade. Para o teste HET-CAM nenhum dos materiais testados apresentou irritação da membrana corion-alantóide, com ressalva aos agentes de união e o verniz fornecido com os reembasadores Tokuso Rebase e Lightdon U, que não podem entrar em contato com a mucosa do paciente.

Em estudo prévio, foi demonstrado que o ácido metacrílico (AM) é um intermediário metabólico de monômeros dentais não polimerizados, liberados por materiais restauradores dentários. Dessa forma, Seiss et al.⁵², em 2007, realizaram estudo para identificar a possibilidade do intermediário ácido 2,3-epoximetacrílico (2,3-EMA), dos monômeros odontológicos, ser metabolizado a partir do ácido metacrílico em microsomas hepáticos humanos. A maioria dos compostos epóxidos são considerados substâncias altamente citotóxicas. A formação e hidrólise foi estudada em sistemas definidos contendo apenas AM e microsomas hepáticos humanos à 37° C. A hidrólise foi inibida pelo óxido de cicloexeno, um inibidor competitivo da epóxido hidrolase. O produto de reação 2,3-EMA foi analisado pela cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Após 5, 30, e 60min, as amostras foram retiradas e analisadas. Os resultados mostraram que, para a reação do AM em 2,3-EMA a taxa média de

conversão foi de, aproximadamente, 5%, dentro de 1h. Foi verificado que sem a presença do óxido de cicloexeno, a taxa constante de hidrólise enzimática, no pH 7,4, foi aproximadamente 10 vezes maior que aquela observada na presença do óxido de cicloexeno, indicando instabilidade e, assim, a alta reatividade do 2,3-EMA. A formação do intermediário do 2,3-EMA a partir do AM não foi observada quando microssomas hepáticos inativados pelo calor foram utilizados (controle). Neste estudo pode ser demonstrado que o 2,3-EMA é um produto do metabolismo de materiais dentários em sistemas biológicos. Dessa forma, maior toxicidade pode ocorrer em materiais restauradores odontológicos que são capazes de liberar monômeros que podem ser metabolizados para AM.

A reação de polimerização química, para as resinas acrílicas, não resulta em total conversão de monômeros em polímeros e, durante o uso desses materiais, ocorre degradação devido a estresses mecânicos, químicos e térmicos, resultando na formação de diferentes produtos, tais como o AM e o AB que são potencialmente irritantes, quando em contato com a mucosa dos pacientes. Assim, para se avaliar a citotoxicidade das resinas acrílicas, é recomendável identificar e quantificar a liberação desses componentes. Para isso, Urban⁶¹, em 2007, realizou um estudo para verificar e quantificar, através da análise por HPLC, os produtos AM e AB liberados pelos materiais reembasadores e avaliar o efeito de tratamento de pós-polimerização em banho de água aquecida sobre a liberação desses componentes. Foram selecionados materiais com diferentes composições, com e sem agente de ligação cruzada (K, NT, U, T). Foram confeccionados 12 discos (50 mm X 2 mm) de cada material que foram, então, divididos em dois grupos (n=6): grupo C- corpos-de-prova sem tratamento (controle); e grupo WB, submetidos a tratamento de pós-polimerização em banho de água aquecida (55° C por 10

min). Em seguida, cada corpo-de-prova foi imerso separadamente em um recipiente plástico, com 20 mL de saliva artificial, e armazenados em condições de 37° C por um período de 30 dias. Alíquotas foram retiradas da solução de imersão nos períodos de 1, 3, 5, e 24h e em 3, 7, 14, e, 30 dias e analisadas imediatamente pelo teste de HPLC e os produtos liberados foram quantificados. O material U apresentou maior liberação de AM na primeira hora, que diminuiu após 3 horas de imersão. Apenas para o material U, o tratamento de pós-polimerização diminuiu a liberação de AM quando comparado ao controle. Para todos os corpos-de-prova do grupo controle, a concentração de AB diminuiu progressivamente com o tempo. O tratamento de pós-polimerização diminuiu a liberação de AB para todos os materiais quando comparado com os controles.

Em 2007, Jorge et al.²⁶ realizaram testes de citotoxicidade celular in vitro de duas resinas acrílicas para base de prótese, com diferentes ciclos de polimerização e dois tipos de tratamento pós-polimerização. Para a realização do teste, foram utilizadas as resinas para base de prótese QC-20, polimerizada em ciclo normal e em ciclo reverso, e a Lucitone 550, polimerizada em ciclo longo e curto. Para cada condição experimental foram confeccionados 3 corpos-de-prova (10 mm X 1 mm) de cada material que foram divididos nos seguintes grupos: 1- pós-polimerização em microondas por 3min a 500 W; 2- pós-polimerização em banho de água a 55° C por 60min; 3- sem pós-polimerização. Eluatos foram obtidos a partir de cada corpo-de-prova, que foram colocados em vidro estéril, contendo 9 ml de meio de cultura complementado com gentamicina e soro fetal bovino, e incubados a 37° C por 24h. Após a obtenção dos eluatos, foi realizado o teste de citotoxicidade através da análise de síntese de DNA em células de fibroblastos de hamster (L929) pelo ensaio de ³H - timidina. Os materiais foram classificados de

acordo com a porcentagem de redução da viabilidade celular em relação ao grupo controle (sem eluato). Foi verificado que a resina Lucitone 550 quando polimerizada pelo ciclo longo apresentou maior citotoxicidade (moderadamente citotóxica) que quando processada utilizando o ciclo curto (não-citotóxica). Além disso, o tratamento de pós-polimerização em água aquecida reduziu a citotoxicidade dessa resina, resultando em nível de redução na viabilidade celular menor que 25% (não citotóxica). A resina QC-20 polimerizada pelo ciclo normal e submetida a tratamento por irradiação em microondas por 3min a 500W apresentou toxicidade considerada moderada (redução entre 50 a 75% da viabilidade celular em relação ao controle).

Moharamzadeh et al.⁴³, em 2007, avaliaram e compararam os efeitos biológicos de três monômeros (TEGDMA; UDMA e bis-GMA) em três linhagens de fibroblastos gengivais humanos (FGH) e em queratinócitos (HaCaT) humanos imortalizados. As análises foram realizadas utilizando ensaios de citotoxicidade e liberação de IL-1 β , enzima correlacionada com processos inflamatórios como gengivite e periodontite. Para a realização dos ensaios, as células FGH e HaCaT foram cultivadas nas mesmas condições, diferindo apenas no tempo de incubação com a tripsina/EDTA, para a separação das células. Os monômeros foram diluídos em DMSO, em concentração máxima de 0,5%, e meio de cultura, com sete diferentes concentrações, variando de 10⁻² a 10 mM. Para o teste de citotoxicidade, as células foram cultivadas em placa de 48 orifícios por 24h e colocadas em contato com as diferentes concentrações de monômeros por mais 24h. Após esse período, foi acrescentado a cada orifício da placa 1 ml de solução com 10% de Azul Alamar e meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM). Após 5h, as amostras foram transferidas para placa de 96 orifícios para a leitura da intensidade de fluorescência em um leitor de fluorescência. O sobrenadante das células foi armazenado anteriormente ao teste de

citotoxicidade para a mensuração do IL-1 β . Essa análise foi realizada em 24 e 72h, por meio do ensaio imuno adsorvente ligada à enzima – ELISA. Os resultados demonstraram que todos os monômeros apresentaram efeitos tóxicos sobre as células FGHS e HaCaT e, em concentrações elevadas, inibiram a redução química de Alamar Blue. Houve diferenças nas respostas celulares quando avaliadas as três linhagens de células. Nenhum dos monômeros induziu a liberação de IL-1 β nos sobrenadantes das células FGHS e HaCaT.

Urban et al.⁶², em 2007, realizaram estudo para avaliar a quantidade de monômero residual (MR) em quatro materiais reembasadores autopolimerizáveis (D, K, TR e U) e uma resina para base de prótese termopolimerizável (Lucitone 550-L), polimerizada por dois ciclos (curto-LC e longo-LL). O efeito de dois tratamentos de pós-polimerização no conteúdo de MR também foi investigado. Foram confeccionados 18 corpos-de-prova circulares (50 mm X 3 mm) para cada material. Após a polimerização, 0,5 mm foram removidos da superfície de cada corpo-de-prova, sobre refrigeração, utilizando-se de lixas em granulações crescentes (80, 600 e 1200). Em seguida, os corpos-de-prova foram divididos em três grupos: G1 (não tratados - controle); G2 (submetidos a tratamento de pós-polimerização em microondas, com diferentes tempos e potências; G3 (submetidos a tratamento de pós-polimerização em banho de água aquecida a 55° C, sendo o tempo de imersão de 60min para a resina L e de 10min para os materiais reembasadores). Amostras de 100 mg foram obtidas de cada corpo-de-prova e colocadas, individualmente, em tubos de vidro contendo 2 ml de metanol. Os tubos foram agitados durante 2h e, após este período, o extrato foi centrifugado em 10.000 r.p.m. por 15min. Aliquotas de 100 μ L da solução de cada tubo foram injetadas no sistema de HPLC, para avaliar a quantidade de MR dos materiais. Os resultados mostraram que, para o grupo controle, houve diferenças

estatisticamente significantes entre os materiais e a quantidade de MR apresentou a seguinte ordem K>D>U>LL>TR>LS. Os valores de MR das resinas TR e LS, após imersão em água aquecida ou irradiação com microondas, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. TR e LS também apresentaram os menores valores de MR em todos os grupos avaliados. As resinas K e D apresentaram as maiores médias de MR em todos os grupos. A imersão em água aquecida reduziu significativamente a quantidade de MR em todos os materiais testados, enquanto a irradiação por microondas reduziu apenas para os materiais K, U e TR. Para os materiais K, D e TR, a redução de MR obtida com a imersão em água aquecida foi significativamente maior que a irradiação por microondas.

O monômero TEGDMA é comumente utilizado em resinas odontológicas. Polímeros dentários polimerizados por luz possuem a conversão de monômeros em polímeros incompleta, liberando compostos não polimerizados na cavidade oral. Além dos monômeros, compostos adicionais podem ser liberados devido à degradação das resinas por ação mecânica e enzimática da saliva. Produtos de degradação associados ao TEGDMA incluem trietileno glicol (TEG), AM, 2,3-EMA e formaldeído. Dessa forma, Emmmler et al.¹⁴, em 2008, avaliaram a citotoxicidade do TEGDMA e seus metabólitos através da mensuração da atividade da enzima mitocondrial desidrogenase verificada pela formação do formazan, produto da clivagem do sal tetrazólico XTT, pela atividade das células A549. Os valores de IC50 (expressos em mmol/L) foram calculados tendo sido obtidos os seguintes valores: 2,3-EMA - 1,65 (1,28-2,13); TEGDMA - 1,83 (1,46-2,30); AM - 4,91 (4,22-5,71) e formaldeído - 5,48 (4,56-6,58). Para o TEG não foi encontrado efeito citotóxico até a concentração de 10mM. O composto epóxido 2,3-EMA induziu efeitos citotóxicos comparáveis aos do monômero TEGDMA. Dessa forma, foi concluído que a

formação de intermediários tóxicos pode contribuir para o efeito citotóxico do monômero TEGDMA em células pulmonares humanas.

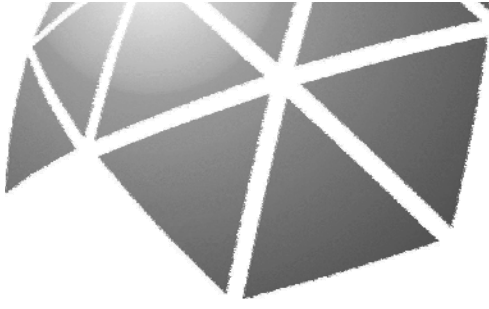
É indispensável à análise da resposta biológica *in vitro* dos materiais odontológicos. Imazato et al.²², em 2009, realizaram estudo para avaliar a hipótese de que eluatos de materiais odontológicos contendo monômeros não polimerizados podem causar efeito inibitório sobre osteoblastos. Foi estudada a liberação de monômeros em resina composta (Clearfil AP-X-Bis-GMA/TEGDMA), cimento resinoso (Superbond C&B-MMA) e ionômero de vidro modificado (Fuji Ionomer Type II- HEMA). De acordo com as concentrações liberadas, osteoblastos (células MC3T3-E1) foram cultivados na presença de TEGDMA, MMA, ou HEMA. Foram analisadas a proliferação celular, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e teste de atividade mitocondrial (MTT), a atividade da fosfatase alcalina (ALP), a expressão de marcadores osteoblásticos e a formação de tecido mineralizado. Para a mensuração da liberação de monômero residual, foram confeccionados três corpos-de-prova (10 mm X 2 mm) para cada material sendo aqueles relativos aos materiais Fuji Ionomer Type II e Clearfil AP-X, polimerizados por 40s, e os do material Superbond C&B, polimerizado por 30min a 25° C. Cada corpo-de-prova foi colocado em 0,5 mL de água destilada e a liberação dos monômeros foi mensurada através da HPLC, nos períodos de 12, 24 e 72h. Foi realizada a cultura das células MC3T3-E1 em meio essencial mínimo- α , suplementado com soro fetal bovino e antibiótico, em umidade de 5% de CO₂. As células foram, então, colocadas e cultivadas em uma placa de 48 orifícios, com densidade de $5,0 \times 10^4$ por orifício, por 24h. Após este período, o meio foi removido e colocado um novo meio com os monômeros diluídos em concentrações determinadas de acordo com os valores obtidos em HPLC, sendo 100, 50 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ para o TEGDMA, 10, 5

e 1 µg/mL para o MMA e 400, 200, 100 e 50 µg/mL para o HEMA e incubados pelos períodos de 3, 7 e 14 dias. A partir do terceiro dia, foi utilizado meio de cultura sem monômeros. Após esses períodos, os meios foram preparados para ser observada a morfologia celular em MEV. Para o teste de MTT, semelhante ao procedimento anterior, após cada período de incubação, foi colocado 50 µg/mL de MTT em solução de 5 mg/mL e a atividade mitocondrial mensurada por absorbância a 570 nm. Os resultados das análises em HPLC mostraram que liberação de TEGDMA foi detectada para Clearfil AP-X após 12-72h de imersão. Superbond C & B mostrou liberação de MMA após 12, 24 e 72h. Liberação de HEMA foi observada para o Ionômero Fuji II LC. Pela análise em MEV foi observado que houve proliferação normal das células até o período de 3 dias para os monômeros TEGDMA e MMA. Para o HEMA, houve inibição no crescimento celular após 3 dias na presença de 400 µg/mL e a densidade e morfologia foram alteradas com 200 µg/mL ou mais após 14 dias. A atividade ALP foi diminuída para o TEGDMA e MMA em todas as concentrações no 3º dia e, para o HEMA, a atividade foi inibida com 100 µg/mL ou superior, com grande supressão na concentração de 200 µg/mL ou superior. O experimento de RT-PCR demonstrou expressão de RNA no tipo I colágeno e osteonectina similares as do grupo controle para os períodos de 7 a 28 dias. Em presença de 200 a 400 µg/mL de HEMA a calcificação foi inibida e não houve formação de tecido mineralizado após 28 dias.

Tratamento de pós-polimerização por imersão em água tem-se mostrado efetivo na redução de monômeros residuais em resinas acrílicas. Essa redução pode contribuir para a diminuição da liberação de substâncias por materiais polimerizados e, conseqüentemente, aumentar a biocompatibilidade e melhorar as propriedades mecânicas. Dessa forma, Urban et al.⁶³, em 2009, através do método de HPLC, quantificaram a liberação de monômero residual e

plastificante em 4 materiais reembasadores rígidos (K, NT, U e T). Foi avaliado também o efeito de tratamento de pós-polimerização na quantidade e liberação de compostos, no grau de conversão dos materiais, na resistência à flexão e na microdureza. Para a análise da liberação de produtos, foram confeccionados 12 corpos-de-prova para cada material, que foram divididos em 2 grupos. Os corpos-de-prova do grupo controle (C), imediatamente após sua confecção foram imersos em saliva artificial à temperatura de $37^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C. Os corpos-de-prova do grupo BA foram imersos em água à 55° C por 10min e, posteriormente, colocados em saliva nas mesmas condições experimentais do grupo controle. Aliquotas de 200 μ L de cada solução foram retirados nos períodos de 1, 3, 5, e 24h e também em 3, 7, 14 e 30 dias e analisadas por meio de HPLC. Para todas as condições analisadas os seguintes compostos foram quantificados: IBMA (K e NT); 1,6 - HDMA (U e T); e DBP (NT). As quantidades dessas substâncias foram calculadas com base em curvas de calibração e expressas em μ g/mL. O grau de conversão de todos os materiais foi avaliado através do uso da espectroscopia Raman. A resistência à flexão foi avaliada utilizando-se do método de flexão em três pontos. Após esse teste, um fragmento de cada corpo-de-prova foi selecionado para avaliação da microdureza Vickers. Os resultados mostraram que NT mostrou maior liberação de IBMA quando comparado com a resina K, e U mostrou maior liberação de 1,6 - HDMA quando comparada com a T. O tratamento de pós- polimerização resultou em diminuição significativa na liberação do monômero IBMA pelos materiais K e N. Contudo, para o monômero 1,6 - HDMA houve redução significativa somente na primeira hora, em relação ao controle. Para o plastificante DBP liberado pela resina NT, ocorreu aumento significativo de liberação de 1 a 3h, seguido de redução com o aumento do tempo de imersão. Após tratamento de pós-polimerização, houve redução da quantidade liberada desse composto e, com 24h, não foi mais identificado. O tratamento BA aumentou o grau de conversão das resinas

K e T; não foram encontradas diferenças significantes para os outros materiais. O tratamento BA aumentou os valores de resistência à flexão apenas do material K e as médias de microdureza para os materiais NT, K e T. Os autores concluíram que o tratamento de pós-polimerização provou ser um método efetivo para reduzir a quantidade e a liberação de monômero residual e plastificante, além de promover melhora nas propriedades mecânicas para alguns dos materiais reembasadores testados.



PROPOSIÇÃO

3 Proposição

O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio dos testes quantitativos de incorporação de ^3H - timidina no DNA e atividade celular pela redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico, a citotoxicidade das seguintes substâncias: monômeros IBMA e 1,6 - HDMA; plastificante DBP; produtos de degradação, AM e AB. Esses compostos foram analisados em faixas de concentrações que abrangem os valores máximos liberados a partir de resinas para reembasamento imediato, em diferentes períodos de imersão em saliva artificial, quantificados em estudos anteriores.



MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Material

- Materiais, instrumentos e aparelhos utilizados para obtenção das soluções, cultura, manutenção e quantificação das células e testes de citotoxicidade

- Ácido benzóico, Merck KGaA, Darmstadt, GER
- Ácido metacrílico, Acros Organics, FairLawn, NJ, USA
- Álcool isopropílico, Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, BR
- Álcool 70%, Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, BR
- Aparelho espectrofotômetro, Labsystems Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Vantaa, FIN
- Aparelho Filtermate Harvester, Unifilter 96 GF/C-Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA
- Azul de tripan, Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, BR
- Balança de precisão Gehaka, Ind. e Com. Eletro - Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo, SP, BR
- Câmara hemocitométrica de Neubauer, Boeco, Hamburg, GER
- Capela de fluxo laminar, Veco do Brasil, Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Campinas, SP, BR
- Centrífuga, Fanem Ltda, São Paulo, SP, BR
- Contador de cintilação, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA
- Di-n-butil ftalato, Acros Organics, FairLawn, NJ, USA
- Estufa para cultura de células, Forma Scientific, Marietta, OH, USA

- Fibroblastos de hamster (células L929), Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, BR
- Frasco para cultura de células, Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA
- 1,6-Hexanediol dimetacrilato, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
- Isobutil metacrilato, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
- Kit para análise colorimétrica MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
- Líquido de cintilação Microscint 20, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA
- Meio de cultura Eagle, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, BR
- Micropipetas, Digipet, Manostat Corp., NY, USA
- Microscópio óptico, Nikon-modelo YS 100, Tokyo, JP
- Pipetador automático, Boeco, Hamburg, GER
- Pipetas graduadas de 10 ml, Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA
- Placa para contador de cintilação com 96 orifícios, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA
- Placa para cultura de células com 96 orifícios, Costar, Corning Incorporated, NY, USA
- Radioisótopo ^3H - timidina, Amesham Pharmacia Biotech do Brasil Ltda, São Paulo, SP, BR
- Soro fetal bovino, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, BR

- Sulfato de gentamicina, Indústria Química e Farmacêutica, Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro, RJ, BR
- Tripsina, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, BR
- Tubos de ensaio, Costar, Corning Incorporated, NY, USA

Método

Neste estudo foi avaliada a citotoxicidade das seguintes substâncias: monômeros IBMA e 1,6-HDMA; plastificante DBP; produtos de degradação, AM e AB. Essas substâncias foram verificadas em faixas de concentrações (Tabela 1), em que os valores máximos e mínimos abrangem os maiores valores que foram liberados por resinas para reembasamento imediato em estudos anteriores^{60,62}. Nesses estudos, amostras das resinas para reembasamento imediato K, NT e U, submetidas ou não a um tratamento de pós-polimerização por meio de imersão em água aquecida a 55° C por 10 min, foram imersas em saliva artificial a 37° C, e as quantidades liberadas foram quantificadas por períodos de até 30 dias. A citotoxicidade foi avaliada por meio de dois métodos: incorporação do radioisótopo ³H - timidina e a redução do sal tetrazólio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil- tetrazólio).

Tabela 1- Substâncias e concentrações avaliadas

Substâncias	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$).	
	Máxima	Mínima
IBMA	200	0,78
1,6 - HDMA	10	0,31
DBP	40	0,31
AM	50	0,78
AB	50	0,39

Cultura e manutenção das células

Fibroblastos de hamsters (células L 929) foram propagados em meio de cultura Eagle, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. O cultivo das células foi realizado em frascos para cultura de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO_2 . Esses frascos foram incubados em estufa para células com 5% de CO_2 , a 37° C e ambiente com umidade controlada.

Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novos frascos a cada período de 3 dias de incubação, até a realização dos testes de citotoxicidade. Para isso, 2 ml de tripsina foram incorporados ao meio de cultura com o objetivo de desprender as células do frasco. Dessa suspensão de células, cada 1 ml foi colocado em novo frasco e 9 ml de meio de cultura suplementado foram adicionados com o auxílio de pipeta graduada e pipetador automático. Cada

frasco foi, então, tampado e levado à estufa para a formação de nova confluência de células.

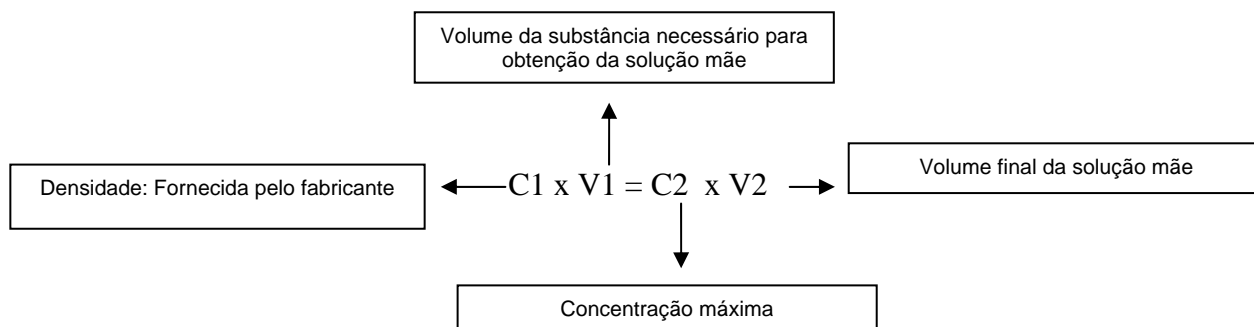
Quantificação das células

Para a realização dos testes de citotoxicidade, uma suspensão de $1,0 \times 10^5$ células/ml de meio de cultura foi preparada. As células foram removidas do frasco com a utilização de tripsina e, em seguida, a suspensão foi colocada em um tubo de 15 ml e levada para a centrífuga, por 5 min a 1.500 rpm, com o objetivo de precipitar as células no fundo do tubo. Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1 ml de meio de cultura Eagle suplementado foi acrescentado e homogeneizado às células. A seguir, 10 μ l foram retirados e adicionados a 90 μ l de corante azul de tripan. Dessa solução, 10 μ l foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica de Neubauer e as células viáveis foram contadas com a utilização de microscópio óptico com aumento de 40 x. 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 o volume da suspensão. Para a realização dos testes de citotoxicidade, 100 μ l da suspensão contendo $1,0 \times 10^5$ células/ml, ou seja, $1,0 \times 10^4$ células/ml, foram colocados em cada um dos compartimentos de uma placa com 96 orifícios e incubada em estufa com 5% de CO₂, a 37° C por 24hs.

Obtenção das soluções

Para obtenção das concentrações a serem testadas, foi utilizado o procedimento de diluição seriada em meio de cultura. Inicialmente, foram preparadas as soluções-mãe de cada uma das substâncias, nas concentrações máximas avaliadas (Tabela 1). Para se determinar o volume necessário de cada substância para a obtenção das soluções-mãe (V1) foi empregada a fórmula A:

Fórmula A:



na qual, C1 corresponde à densidade das substâncias fornecidas pelos respectivos fabricantes; C2 representa a concentração máxima a ser avaliada; V2 é o volume final da solução-mãe, pré-estabelecido com base na quantidade de meio de cultura necessário para a realização dos testes de citotoxicidade.

O volume V1 calculado com a aplicação dessa fórmula, corresponde a 100% do volume da substância necessário para a obtenção da concentração máxima da solução-mãe. Entretanto, os monômeros IBMA e 1,6 - HDMA, o plastificante DBP e o produto de degradação AM apresentam baixa solubilidade. Em função disso, para a obtenção da solução-mãe desses compostos,

em meio de cultura, foi necessária a diluição prévia em dimetilsulfóxido (DMSO). Esse diluente deve estar presente em até 0,5% da concentração final da substância a ser avaliada^{21,31,43}. Assim, a partir do valor V1, foi determinado o volume de DMSO (V2) permitido para cada substância, por meio do seguinte cálculo:

$$V1 \text{ _____ } 100 \%$$

$$V2 \text{ _____ } 0,5 \%$$

$$V2 = \frac{V1 \times 0,5\%}{100\%}$$

Dessa forma, para a substância IBMA, em que a concentração máxima avaliada foi de 200 µg/ml (C2), a densidade fornecida pelo fabricante é de 0,886 g/ml (C1) e o volume final necessário para a realização dos experimentos de citotoxicidade foi de 10 ml (V2), o valor de V1 foi calculado por meio da fórmula A:

$$0,886\text{g/ml} \times V1 = 200\mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml}$$

$$0,886\text{g/ml}V1 = 200 \times 10^{-6}\text{g/ml} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,0022573 \text{ ml}$$

$$V1 = 2.257,3 \mu\text{l}$$

Obtido o valor V1, foi, então, calculado o volume de DMSO (V2) para essa solução-mãe:

$$2.257,3 \text{ ————— } 100\%$$

$$V2 \text{ ————— } 0,5\%$$

$$V2 = 11,3 \mu\text{l}$$

Assim, o volume de IBMA utilizado na solução-mãe de concentração máxima foi equivalente a:

$$2.257,3 \mu\text{l} - 11,3 \mu\text{l} = 2.246 \mu\text{l}$$

O IBMA e o DMSO, nos volumes calculados, foram colocados em um tubo de ensaio, a solução foi homogeneizada e 7.743,7 ml de meio de cultura Eagle foram adicionados, para uma solução final de 10 ml, obtendo-se a concentração máxima. A partir dessa solução-mãe foi feita diluições seriadas (Figura 1) até obtenção da concentração mínima (0,78 $\mu\text{g/ml}$).

Seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para o IBMA, as soluções-mãe das substâncias 1,6 - HDMA (10 $\mu\text{g/ml}$), DBP (40 $\mu\text{g/ml}$) e AM (50 $\mu\text{g/ml}$) foram obtidas e serialmente diluídas em meio de cultura Eagle até as concentrações mínimas desejadas (1,6 - HDMA - 0,31 $\mu\text{g/ml}$; DBP - 0,31 $\mu\text{g/ml}$; AM - 0,78 $\mu\text{g/ml}$).

Considerando-se que o AB é solúvel, não foi necessária sua diluição prévia em DMSO. Dessa forma, para a obtenção da solução-mãe, na concentração máxima (50 $\mu\text{g/ml}$), foi calculado apenas o valor de V1, realizando-se a diluição seriada até a concentração mínima avaliada (0,39 $\mu\text{g/ml}$).



FIGURA 1- Diluição seriada

Teste de citotoxicidade ^3H - Timidina

Neste teste a citotoxicidade das substâncias foi analisada pela quantificação da incorporação do radioisótopo ^3H - timidina, que indica o número de células viáveis pela síntese de DNA. Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura de cada orifício da placa foi substituído por 20 μl de meio de cultura Eagle contendo 0,25 μCi de ^3H – timidina, juntamente com 50 μl de meio de cultura novo e 50 μl das soluções a serem testadas (IBMA, 1,6 - HDMA, DBP, AM e AB), nas concentrações obtidas pela diluição seriada. Para cada condição experimental, foram destinados cinco compartimentos de placa. Para as substâncias IBMA, 1,6 - HDMA, DBP e AM, cinco orifícios da placa receberam apenas a solução de ^3H – timidina e 100 μl de meio de cultura Eagle novo com

DMSO, em concentração máxima de 0,5%, servindo, dessa forma, como controle. Para controle do AB, as células receberam a solução de ^3H – timidina e 120 μl de meio de cultura Eagle novo. Após o período de 24 horas em estufa com 5% de CO_2 à temperatura de 37°C , em cada orifício da placa foram colocados 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 ao aparelho Filtermate Harvester (Figura 2), onde o sobrenadante foi descartado e as células marcadas com o material radioativo foram aspiradas, ficando retidas em filtros de outra placa de 96 orifícios branca. 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 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 (Figura 3). Através da vibração do líquido de cintilação, a qual ocorre devido à síntese de DNA, é que o contador de cintilação realizou a leitura. Os resultados foram expressos em uma contagem por minuto (cpm)



FIGURA 2 - Aparelho Filtermate Harvester



FIGURA - 3. Contador de cintilação

MTT

O método de MTT tem como princípio a redução do sal MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólio, pela desidrogenase mitocondrial das células vivas, para um produto de reação formazan. Após as células L929 terem sido incubadas por período de 24 horas, o meio de cultura foi descartado e 50 µl de meio novo juntamente com 50 µl das soluções a serem testadas, nas concentrações obtidas pela diluição seriada, foram colocados em cada orifício da placa. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas em estufa com 5% de CO₂, a 37° C. Para cada condição experimental, foram destinados seis compartimentos da placa. Para as substâncias IBMA, 1,6 - HDMA, DBP e AM, seis orifícios da placa contendo apenas 100µl de meio de cultura Eagle novo com DMSO, em concentração máxima de 0,5 %, foram utilizados como controle. No caso do produto de degradação AB, orifícios contendo somente células e 100 µl de meio de cultura novo foram utilizados como controle. Após o período de incubação de 24 horas, o meio foi removido e 100 µl da solução do sal de tetrazólio MTT (5 mg de MTT, 1 ml de salina fosfatada tamponada estéril e 4 ml de meio de cultura) foram adicionados a cada orifício da placa, a qual permaneceu incubada por um período de 4 horas a 37° C para a formação dos cristais de formazan, decorrentes da atividade mitocondrial. Em seguida, o meio de cultura com a solução de MTT foi removido e 100 µl de solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N foram colocados em cada orifício para solubilizar os cristais de formazan formados. Posteriormente, a análise da atividade mitocondrial foi realizada em espectrofotômetro Multiskan

(Figura 4) com comprimentos de onda de 540 nm e 620nm. Os valores de absorvância foram calculados pelas diferenças entre os valores mensurados em cada comprimento de onda, obtendo-se a atividade mitocondrial.



FIGURA 4 - Espectrofotômetro

É importante salientar que todos os procedimentos foram realizados em áreas assépticas, dentro da capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70%, com o operador utilizando roupa de proteção, luvas, óculos, máscara descartável, instrumental e materiais esterilizados em autoclave.

Metodologia estatística

O estudo da citotoxicidade dos monômeros IBMA e 1,6 - HDMA, do plastificante DBP e dos produtos de degradação, AM e AB, em diversas concentrações, foi realizado pela avaliação da viabilidade celular em relação ao controle, em porcentagem.

Em ambos os métodos de citotoxicidade empregados no presente estudo (^3H - timidina e MTT), a porcentagem de viabilidade foi analisada observando-se os gráficos aos quais foram adicionados intervalos de confiança de 95% para as médias de porcentagem de viabilidade em cada concentração estudada. Os intervalos de confiança de 95% permitem avaliar a precisão sobre a média de viabilidade celular. Quanto maior a sobreposição desses intervalos, menor a evidência de diferença entre as médias de porcentagem de viabilidade nas diversas concentrações avaliadas.

Nos gráficos de porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle foi utilizada uma escala horizontal logarítmica decimal de modo a facilitar a visualização e interpretação dos resultados; porém, os valores indicados nessa escala são as concentrações originais. Além disso, linhas de grade horizontais foram colocadas para dividir a escala vertical em faixas de comprimento de 30%. Essas faixas permitem confrontar as médias de viabilidade celular obtidas com a classificação de efeito citotóxico estabelecido pela ISO 10993-5²³:

- não-citotóxico: viabilidade celular acima de 90% em relação ao controle;
- discretamente citotóxico: viabilidade celular entre 60 e 90% em relação ao controle;
- moderadamente citotóxico: viabilidade celular entre 30 e 60% em relação ao controle;
- intensamente citotóxico: viabilidade celular igual ou abaixo de 30% em relação ao controle.



RESULTADO

5 RESULTADO

Os valores obtidos durante os testes de citotoxicidade das substâncias avaliadas nas diversas concentrações, por meio dos métodos ^3H - timidina (cintilação por minuto – cpm) e MTT (absorbância), estão apresentados nas Tabelas 1 a 5 dos Apêndices A e B, respectivamente.

Nas Tabelas 2 a 6 estão apresentados as médias e os desvios padrão de viabilidade celular em relação ao controle (%) obtidas nos testes ^3H - timidina e MTT nas diversas concentrações avaliadas de IBMA, 1,6 – HDMA, DBP, AM e AB, respectivamente.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão de viabilidade celular (%) nas concentrações de IBMA para os métodos ^3H - timidina e MTT

Método		Concentração de IBMA ($\mu\text{g/mL}$)								
		0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	200
^3H	Média	108,0	106,6	91,4	106,8	102,5	53,9	43,8	4,0	3,9
	DP	27,7	32,6	9,3	14,9	34,7	8,4	16,4	6,7	3,9
MTT	Média	101,7	84,5	62,7	7,6	9,4	8,0	7,7	8,2	6,6
	DP	12,5	12,8	7,8	2,3	2,1	1,2	1,0	1,2	1,6

Tabela 3 - Médias e desvios padrão de viabilidade celular (%) nas concentrações de 1,6 - HDMA para os métodos ^3H - timidina e MTT

Método		Concentração de 1,6 - HDMA ($\mu\text{g/mL}$)					
		0,31	0,62	1,25	2,5	5	10
^3H	Média	4,5	1,3	1,5	1,7	1,7	1,4
	DP	3,1	0,5	0,5	1,6	1,2	0,7
MTT	Média	74,2	24,3	10,9	11,5	11,4	11,4
	DP	18,8	5,1	2,1	1,9	2,6	3,3

Tabela 4 - Médias e desvios padrão de viabilidade celular (%) nas concentrações de DBP para os métodos ^3H - timidina e MTT

Método		Concentração de DBP ($\mu\text{g/mL}$)							
		0,31	0,62	1,25	2,5	5	10	20	40
^3H	Média	60,0	32,6	21,9	11,8	2,6	6,1	1,5	1,5
	DP	15,0	10,5	4,2	3,9	0,8	3,5	0,3	0,4
MTT	Média	82,5	23,9	26,2	19,5	19,7	22,3	28,8	28,3
	DP	4,8	3,1	5,1	3,1	2,4	5,4	8,1	5,1

Tabela 5 - Médias e desvios padrão de viabilidade celular (%) nas concentrações de AM para os métodos ^3H - timidina e MTT

Método		Concentração de AM ($\mu\text{g/mL}$)						
		0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
^3H	Média	3,0	0,5	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4
	DP	0,6	0,1	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1
MTT	Média	37,5	34,1	33,6	47,8	43,9	46,8	39,6
	DP	10,2	3,8	3,6	9,4	10,0	2,9	8,7

Tabela 6 - Médias e desvios padrão de viabilidade celular (%) nas concentrações de AB para os métodos ^3H - timidina e MTT.

Método		Concentração de AB ($\mu\text{g/mL}$)							
		0,39	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
^3H	Média	45,8	34,2	39,6	42,3	43,7	39,1	28,6	32,0
	DP	10,5	3,2	9,8	10,4	9,3	5,7	8,3	4,9
MTT	Média	123,4	73,1	102,7	94,1	93,4	92,5	94,6	96,3
	DP	17,0	14,9	14,9	19,1	16,5	18,8	14,3	16,3

As Figuras 5 a 9 apresentam os gráficos com as porcentagens de viabilidade celular em relação ao controle, para os dois métodos de citotoxicidade empregados: ^3H - timidina e MTT. O modelo que descreve o comportamento da porcentagem de viabilidade celular em função do logaritmo da concentração das substâncias avaliadas é sabidamente de uma sigmóide, tanto por resultados

apresentados na literatura como por alguns gráficos obtidos no presente trabalho. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade das substâncias IBMA, 1,6 - HDMA, DBP, AM e AB na faixa de concentrações observadas em pesquisa anterior^{61,63}. Por meio de análise em HPLC, foi avaliada, quantitativamente, a liberação dessas substâncias a partir de diferentes resinas autopolimerizáveis para reembasamento imediato quando imersas em saliva artificial a 37° C por períodos de até 30 dias. Dessa forma, devido às faixas de concentrações estabelecidas para o objetivo deste trabalho, não foi possível definir uma expressão matemática da sigmóide obtida. Em ambos os métodos de citotoxicidade empregados no presente estudo (³H - timidina e MTT), a porcentagem de viabilidade foi, então, analisada por meio de gráficos, aos quais foram adicionados intervalos de confiança de 95% para as médias de porcentagem de viabilidade em cada concentração estudada. Os intervalos de confiança de 95% permitem avaliar a precisão sobre a média de viabilidade celular. Quanto maior a sobreposição desses intervalos, menor a evidência de diferença entre as médias de porcentagem de viabilidade nas diversas concentrações avaliadas. Com o objetivo de facilitar a visualização e interpretação dos resultados, foi utilizada uma escala horizontal logarítmica decimal. Entretanto, os valores indicados nessa escala são as concentrações originais avaliadas. As linhas de grade horizontais dividem a escala vertical em faixas de comprimento de 30% e permitem analisar as médias de viabilidade celular obtidas, em relação ao controle, e relacioná-las com a classificação de citotoxicidade da ISO 10993-5²³, que estabelece: não citotóxico > 90% de viabilidade celular, discretamente citotóxico = 60-90% de viabilidade celular,

moderadamente citotóxico = 30-60% de viabilidade celular e intensamente citotóxico \leq 30% de viabilidade celular.

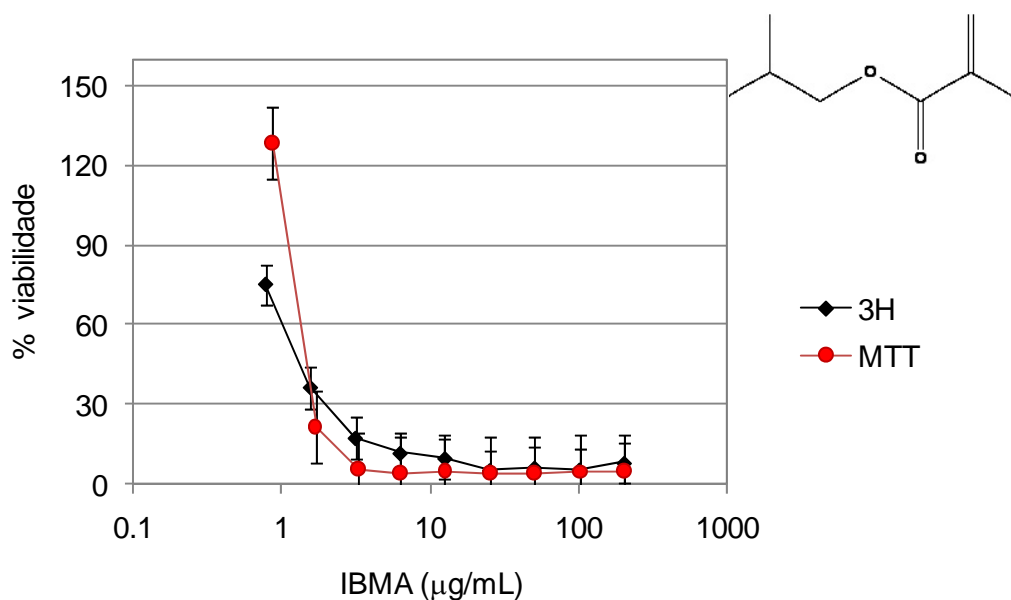


FIGURA 5 - Médias amostrais e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) de viabilidade celular (%) nas concentrações de IBMA para os métodos ^3H - timidina e MTT.

Na Figura 5 encontra-se o gráfico referente às concentrações testadas do monômero IBMA. No teste ^3H - timidina, as concentrações de 200 à 3,12 $\mu\text{g/mL}$ foram intensamente citotóxicas, a de 1,56 moderadamente citotóxica, enquanto a concentração 0,78 $\mu\text{g/mL}$ foi ligeiramente citotóxica. No teste MTT, entretanto, as concentrações entre 200 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$ foram intensamente citotóxicas e a de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ foi não citotóxica.

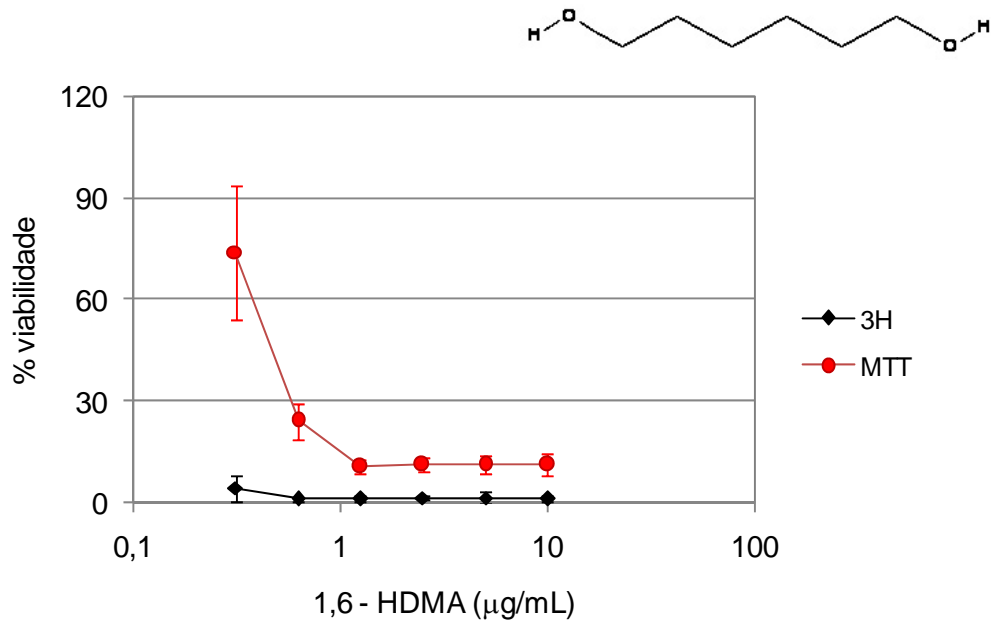


FIGURA 6 - Médias amostrais e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) de viabilidade celular (%) nas concentrações de 1,6 - HDMA para os métodos ^3H - timidina e MTT.

A Figura 6 representa as concentrações avaliadas para o monômero 1,6 - HDMA. No teste ^3H - timidina, todas as concentrações foram intensamente citotóxicas, o que também foi observado no ensaio de MTT, com exceção da concentração de 0,31 µg/mL que se apresentou discretamente citotóxica.

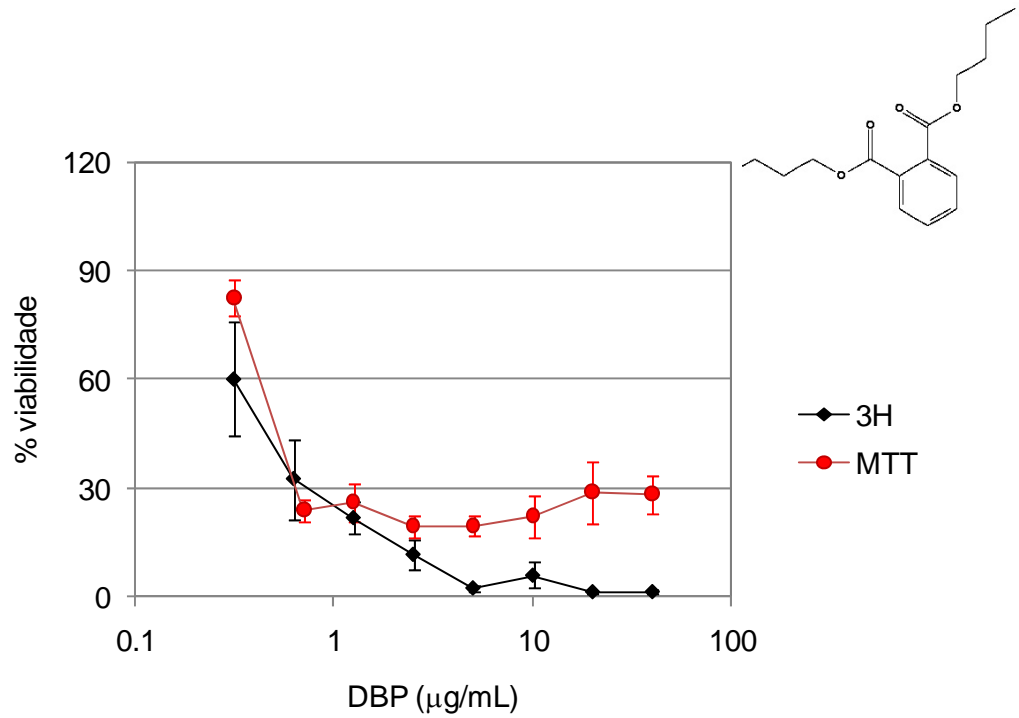


FIGURA 7 - Médias amostrais e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) de viabilidade celular (%) nas concentrações de DBP para os métodos ^3H - timidina e MTT.

Na Figura 7, observa-se o gráfico da substância DBP referente às concentrações estudadas. Para o teste do ^3H - timidina, as concentrações entre 40 à 1,25 $\mu\text{g/mL}$ foram intensamente citotóxicas, enquanto as concentrações de 0,62 e 0,31 $\mu\text{g/mL}$ foram moderadamente citotóxicas. Para o teste MTT, todas as concentrações apresentaram-se intensamente citotóxicas, com exceção da concentração de 0,31 $\mu\text{g/mL}$ que se mostrou discretamente citotóxica.

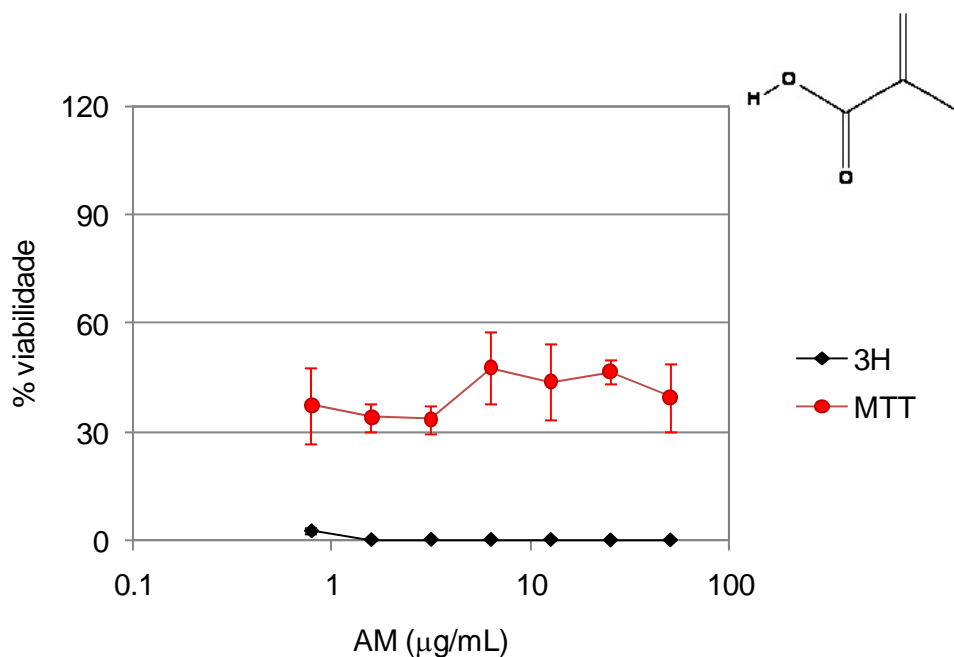


FIGURA 8 - Médias amostrais e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) de viabilidade celular (%) nas concentrações de AM para os métodos ^3H - timidina e MTT.

O gráfico referente às concentrações estudadas do produto de degradação AM encontra-se na Figura 8. No teste do ^3H - timidina, todas as concentrações foram intensamente citotóxicas. No ensaio de MTT, contudo, todas as concentrações apresentaram-se moderadamente citotóxicas.

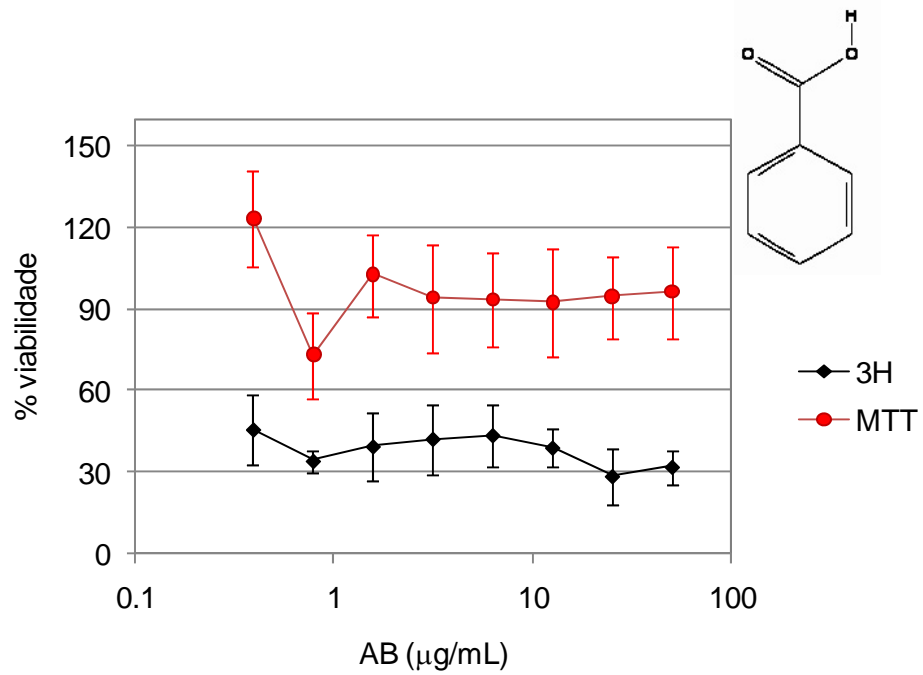


FIGURA 9 - Médias amostrais e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barras verticais) de viabilidade celular (%) nas concentrações de AB para os métodos ^3H - timidina e MTT.

Na Figura 9 visualiza-se o gráfico relativo ao produto de degradação AB, nas concentrações testadas. Para o teste de ^3H - timidina, todas as concentrações apresentaram-se moderadamente citotóxicas. Enquanto no teste de MTT, todas as concentrações apresentaram-se não-citotóxicas, com exceção da concentração de 0,78 µg/mL que foi discretamente citotóxica.



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Desde a introdução das resinas acrílicas em 1930, reações alérgicas e de irritação química local a esses materiais têm sido relatadas na literatura^{1,16,65}. O principal sintoma mencionado é a queimação ou ardência na cavidade bucal¹⁶, envolvendo palato¹, língua, mucosa labial e tecido da faringe^{1,65}. Os principais sinais observados são inflamação na mucosa, vesículas e ulcerações^{1,16,65}. Alterações sistêmicas, como urticária, devido ao uso de próteses confeccionadas com resinas acrílicas à base de metil metacrilato (MMA), também foram relatadas³⁸. Testes de contato em pacientes que apresentaram sensibilidade comprovaram reação alérgica às resinas acrílicas e aos seus componentes^{1,16}.

As reações adversas causadas pelas resinas acrílicas para base de prótese têm sido correlacionadas a substâncias que são liberadas por esses materiais, entre as quais o monômero residual^{1,7,12,16,20,25,26,28,30,35,43,48,50,59,60,64,65}. Na reação de polimerização das resinas acrílicas, a conversão de monômero em polímero não é completa e, dessa forma, certa quantidade de monômero residual permanece no material polimerizado. Um aspecto que tem sido observado é que as resinas ativadas quimicamente usualmente contêm maior quantidade de monômero residual que as termopolimerizáveis^{28,64}.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o monômero residual presente nas resinas acrílicas para base de prótese pode ser liberado em meios aquosos^{28,30,59,60}. Resinas autopolimerizáveis, termopolimerizáveis e polimerizadas por irradiação

em microondas, quando imersas em saliva artificial ou humana liberaram MMA em todos os meios de imersão^{30,59,60}. Estudos *in vivo* também comprovaram a liberação de monômero residual por resinas acrílicas^{5,60}. Os resultados desses estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que, em geral, as resinas quimicamente ativadas liberam quantidades maiores de monômero residual^{5,28,30,59,60} e esse tipo de resina tem sido freqüentemente associada com reações adversas^{16,65}. Kedjarune et al.²⁸, em 1999, observaram que as resinas com baixa quantidade de monômero residual, também apresentaram baixa liberação de MMA. Contudo, resinas com alta concentração de monômero residual, não necessariamente, resultaram em maior liberação de MMA. Assim, a liberação pode variar dependendo do material, demonstrando a necessidade de se avaliar as diferentes resinas acrílicas comercialmente disponíveis.

Além das resinas para base de prótese, compostas por MMA, outras resinas autopolimerizáveis têm sido desenvolvidas para a realização do reembasamento imediato^{2,8,31,42,61,62}. Essas resinas também contêm monômero residual após sua reação e em quantidades maiores que resinas para base de prótese termopolimerizável⁶². Semelhante ao que ocorre com as resinas acrílicas para base de prótese, nos materiais reembasadores também pode ocorrer a liberação de monômero não reagido. Urban⁶¹, em 2007, realizou estudo com o objetivo de quantificar a liberação em saliva artificial de monômeros residuais de materiais reembasadores rígidos, em diferentes intervalos de tempo e verificaram que houve liberação de monômero para todos os materiais. Esses resultados demonstram que, da mesma

forma que o MMA, a liberação de outros monômeros a partir das resinas para reembasamento imediato, pode desencadear reações adversas e estar relacionada com os efeitos tóxicos verificados com esses materiais *in vitro*⁸ e *in vivo*⁴². Estudos têm avaliado outros monômeros utilizados na composição de diversos polímeros odontológicos e verificaram que eles também podem ser tóxicos. Entre os monômeros avaliados podemos citar o TEGDMA, o uretano dimetacrilato (UDMA) e o bisfenol A glicerolato dimetacrilato (Bis-GMA)^{43,58}, HEMA⁵⁸, monoacrilatos e monometacrilatos que apresentam grupamento éster alquílico, monometacrilatos com grupos funcionais e dimetacrilatos⁶⁸.

Além do monômero residual, as resinas acrílicas podem liberar outros tipos de substâncias, entre as quais o formaldeído^{47,59,60}, além do AM e AB, formados, provavelmente, pela degradação do MMA e do peróxido de benzoíla, respectivamente³⁰. Os estudos de Lygre et al.³⁹⁻⁴⁰, *in vitro*(1995) e *in vivo*(1993) demonstraram a liberação de outras substâncias como os plastificantes dibutil ftalato, bifenil, dicitlohexil ftalato e fenil benzoato. Um aspecto importante observado nos estudos mencionados é que as resinas autopolimerizáveis liberam maior quantidade de formaldeído^{47,59,60}, AM e AB³⁰, quando comparadas com as resinas termoativadas ou polimerizadas por microondas.

Em função dos aspectos mencionados, a biocompatibilidade das resinas acrílicas para base de prótese^{7,9,10,20,21,25,26,28,30-35,50,53,60} e para reembasamento imediato tem sido avaliada^{8,11,31}. Têm-se observado que as substâncias liberadas pelas

resinas acrílicas para base de prótese termopolimerizáveis ou fotopolimerizáveis podem causar efeito tóxico às células epiteliais orais³⁴, afetar o metabolismo de lipídeos e resultar em alterações nas membranas celulares⁵⁰. Estudos têm indicado que a ativação química pode resultar em resinas que apresentam potencial tóxico maior que aquelas polimerizadas pelo calor (em banho de água aquecida ou irradiação com microondas) ou por luz^{7,9,10,21}. Além disso, enquanto vários estudos têm avaliado a citotoxicidade das resinas para base de prótese, existe pouca informação em relação às resinas indicadas para o reembasamento imediato, sobretudo as autopolimerizáveis. Nos poucos estudos realizados, foi verificado que esses materiais também podem apresentar efeitos citotóxicos. Dahl et al.¹¹, em 2006, avaliaram a biocompatibilidade de 11 materiais reembasadores para base de prótese e observaram que apenas dois (um fotopolimerizável e um com polimerização dual) não apresentaram citotoxicidade. Campanha et al.⁸, em 2006, compararam a citotoxicidade de cinco materiais reembasadores para base de prótese autopolimerizáveis e um fotopolimerizável. Houve inibição significativa da síntese de DNA para os eluatos obtidos de dois materiais autopolimerizáveis. Quando analisados pela atividade metabólica celular, um material autopolimerizável e a resina fotopolimerizável produziram diminuição significativa na viabilidade celular comparados com o grupo controle. Testes de biocompatibilidade dos líquidos de diferentes materiais reembasadores também revelaram que eles são citotóxicos, devendo ser utilizados com cautela³¹.

Tendo em vista os efeitos tóxicos das resinas acrílicas, tratamentos de pós-polimerização têm sido sugeridos com a finalidade de reduzir a quantidade de monômeros residuais, melhorando a biocompatibilidade dos materiais. Os estudos de Urban et al.^{61,62,63}, em 2007, 2007 e 2009, quantificaram e comprovaram que os tratamentos de pós-polimerização diminuíram tanto o conteúdo de monômero residual que permanece na resina polimerizada, como também a liberação desse monômero e de produtos de degradação por resinas para base de prótese e materiais reembasadores autopolimerizáveis. Resultados semelhantes foram obtidos por Jorge et al.²⁶, em 2007, que verificaram que o tratamento por imersão em água aquecida reduziu a citotoxicidade da resina termopolimerizável. Por outro lado, Campanha et al.⁸, em 2006, observaram que tratamentos de pós-polimerização não influenciaram o grau de citotoxicidade de materiais reembasadores, quando avaliados pelo teste de MTT. Esses tratamentos diminuíram a citotoxicidade de um dos materiais, quando analisado pelo teste de ³H-Timidina. Além desses tratamentos, outros procedimentos como imersão em água^{5,33,45,50,59,61} por 24 horas antes da colocação da prótese no paciente tem sido recomendado. Tsuchiya et al.⁵⁹, em 1994, sugeriram a imersão das próteses de resina acrílica em água a 50° C, por pelo menos 60 minutos, antes da instalação, para diminuir seu potencial citotóxico, principalmente para as resinas autopolimerizáveis utilizadas para a confecção ou o reembasamento de próteses.

Uma metodologia usualmente empregada nos estudos de toxicidade de resinas acrílicas envolve a confecção de corpos-de-prova e obtenção de eluatos que são colocados em contato com as células. Após períodos de incubação, o efeito

citotóxico é avaliado^{7-11,20,21,26,33-35,50,53}. Apesar de fornecer informações importantes sobre a toxicidade dos materiais, essa metodologia não permite identificar quais as substâncias foram responsáveis pelos efeitos observados. Outros estudos realizam os testes de citotoxicidade utilizando monômeros empregados na formulação de resinas, diluídos no meio de cultura para se obter as concentrações a serem testadas^{11,12,28,31,43,58,22,68}. Entretanto, usualmente, os estudos têm utilizado concentrações arbitrárias que podem não refletir as quantidades de monômeros efetivamente liberados pelos materiais. Poucos estudos têm utilizado concentrações com base em análise prévia das quantidades liberadas por resinas acrílicas para base de prótese^{28,60}. Em relação às resinas para reembasamento, as informações são ainda mais restritas. Somente os estudos de Urban^{61,63}, em 2007 e 2009, determinaram a quantidade de compostos liberados por diferentes materiais reembasadores rígidos. Corpos-de-prova de cada material reembasador foram fabricados e armazenados em saliva artificial por 37° C. Em diferentes intervalos (1, 3, 5 e 24h, e também em 3, 7, 14 e 30 dias) alíquotas das soluções foram retiradas e analisadas. Os seguintes compostos foram quantificados: IBMA (K e NT), 1,6 - HDMA (U), DBP (NT) e produtos de degradação AM e AB (K, NT e U). O efeito de um tratamento de pós-polimerização (imersão dos corpos-de-prova em água a 55° C por 10 min) na liberação de componentes residuais também foi avaliado. Entretanto, os possíveis efeitos tóxicos dessas concentrações ainda não haviam sido investigados. Assim, no presente estudo, os testes de citotoxicidade das substâncias avaliadas foram realizados utilizando-se faixas de concentrações

abrangendo os valores máximos liberados pelas 4 resinas reembasadoras nos diversos períodos e condições experimentais avaliadas.

Vários métodos têm sido empregados para avaliar a biocompatibilidade dos materiais odontológicos, dentre eles, estudos em animais e em cultura de células. Testes de materiais em cultura de células são relativamente simples, facilmente reproduzíveis e de custo acessível e, por estes motivos, tem sido freqüentemente utilizados. Experimentos em animais possuem muitas variáveis difíceis de serem controladas e custo elevado, quando comparado com testes de cultura celular^{25,33,49}. A avaliação *in vitro* da citotoxicidade (danos celulares) ou genotoxicidade (danos em DNA ou aberrações cromossômicas) dos materiais tem sido realizada por meio de diferentes ensaios. Os testes de genotoxicidade podem ser realizados com bactérias ou células humanas e o contato material/células pode ser de forma indireta ou direta⁴⁹. Para análise da atividade celular, os testes empregados baseiam-se na mensuração da taxa de metabolismo de determinadas substâncias como, por exemplo, atividade de uma enzima como no teste MTT^{8,11,21,22,28,31,37,44,45,53,57,58,68} ou incorporação do radioisótopo ³H - timidina^{7,8,26,34,57}. O teste MTT reflete a respiração mitocondrial^{8,11,22,26,31,44,57,58,68} e é baseado na mensuração da enzima desidrogenase mitocondrial, sendo realizado pela conversão do sal tetrazólio em azul formazan, facilmente detectado pelo espectrofotômetro. Dessa forma, quanto maior a atividade mitocondrial, maior o número de células viáveis^{35,34,44}. É um teste simples, sem necessidade de radioisótopo, com poucas etapas e reduzido tempo laboratorial. Assim, este método colorimétrico tem sido

largamente utilizado para estimar a citotoxicidade de polímeros dentais in vitro^{8,11,22,26,31,44,57,58,68}. O teste ³H-timidina mensura a incorporação da timidina marcada na nova síntese de DNA que serve de referência para mensurar a proliferação celular^{6,8,26,44,57} e uma baixa incorporação demonstra toxicidade. É um teste facilmente realizado no laboratório; contudo, requer área asséptica, líquido de cintilação, equipamento especial de alto custo e a utilização de radioisótopo, com formação de descarte radioativo^{6,33}. Alguns autores^{8,49,57,26}, entretanto, afirmam de acordo com os seus resultados, que, entre os testes utilizados nesses experimentos, o mais sensível é o de incorporação de DNA (³H - timidina). Tang et al.⁵⁷, em 1999, atribuiu a diferença entre os dois métodos ao fato de que o teste de ³H – timidina reflete a habilidade das células em sintetizar DNA na população de células que estão se dividindo, enquanto o teste de redução do MTT reflete a atividade enzimática que pode ocorrer na ausência de proliferação. Assim, a proliferação celular pode ser mais sensível que as células que não estão dividindo. Dessa forma, segundo Mosmman⁴⁴, em 1983, o idealizador do método colorímetro (MTT), para a seleção do teste a ser aplicado deve ser considerado qual aspecto específico será analisado, fazendo a distinção entre morte, viabilidade e proliferação celular. Segundo Tang et al.⁵⁷, em 1999, embora o teste ³H-Timidina tenha sido mais sensível à toxicidade das resinas avaliadas que o MTT, este último método obteve resultados mais reprodutíveis e pode trazer mais informações sobre a natureza da toxicidade. Além disso, a utilização de mais de um método para avaliar os efeitos citotóxicos de polímeros odontológicos pode fornecer informações complementares importantes sobre processos celulares

diferentes (sobrevivência e proliferação). Assim, no presente estudo, a citotoxicidade dos compostos testados foi avaliada pelo teste de ^3H – timidina e também pela redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico (MTT). Similar aos resultados de outros estudos, os valores de viabilidade celular mensurados pelo teste de ^3H – timidina foram, em geral, mais baixos que aqueles obtidos com o ensaio do MTT.

Para a realização dos testes mencionados, diferentes linhagens celulares têm sido utilizadas^{6,8-11,20,21,26,28,31,35,34,33,37,43,50,53,57,58,66}. Células de linhagem contínua, como fibroblastos de hamster L929, têm sido freqüentemente utilizadas por causa de sua reprodutibilidade e respostas biológicas. Células de linhagem primária, apesar de representarem situação clínica mais próxima, apresentam desvantagens práticas, como: tempo para isolar a célula e necessidade de laboratório no momento da obtenção do tecido, poucas células quando cultivadas e tempo de vida limitado⁵⁸. Thonemann et al.⁵⁸, em 2002, realizaram testes para verificar a sensibilidade de uma linhagem primária, uma transformada e células L929 frente a monômeros utilizados em produtos odontológicos e observaram que esta última foi mais sensível. Com base nessas informações, as células L929 foram selecionadas para avaliar a citotoxicidade dos compostos testados no presente estudo.

Os resultados demonstraram que o monômero IBMA exibiu um efeito dose dependente. Para os dois testes de citotoxicidade, a sobrevivência celular aproximou-se de zero na maior parte das concentrações avaliadas, e o composto foi

classificado como intensamente citotóxico. Os resultados também demonstraram que o IBMA em concentrações de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ foi moderadamente citotóxico, enquanto em concentrações abaixo de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ foi considerado discretamente e não citotóxico. Yoshii⁶⁸, em 1999, observou correlação entre o efeito citotóxico de monometacrilatos e seus valores de logaritmo de coeficiente de partição octanol/água ($\log P$), que está diretamente relacionado com a lipofilicidade dos monômeros. Fujisawa et al.¹⁵, em 1988, também hipotetizaram que os efeitos citotóxicos dos monômeros metacrilatos ocorrem devido a alterações das membranas celulares, incluindo a migração de pequenos metacrilatos, solúveis em lipídios, na dupla camada lipídica e a solubilização dessa camada. A correlação entre os valores de $\log P$ e os tempos de retenção dos monômeros em cromatogramas obtidos por meio de HPLC tem sido demonstrada⁵⁴. O $\log P$ (2,13)³ e o tempo de retenção (8 min)⁶² do monômero IBMA são maiores que os do monômero MMA ($\log P$ – 0,73; tempo de retenção – 4,5 min)^{3,62}, comumente utilizado em resinas para base de prótese. O monômero IBMA, quando testado em concentrações semelhantes do MMA, resultou em baixa viabilidade celular³¹. Assim, podemos supor que a lipofilicidade é um fator importante para a ação citotóxica do monômero IBMA sobre as células L929 observada no presente estudo.

Os testes de MTT e ³H-Timidina demonstraram que o monômero 1,6 – HDMA foi intensamente citotóxico para as células L929, com exceção da concentração de 0,31 $\mu\text{g/mL}$, que induziu discreta citotoxicidade no teste de MTT.

Esses resultados estão de acordo com os relatados por Lai et al.³¹, em 2004, que observaram que o monômero 1,6 – HDMA causou efeito citotóxico intenso em fibroblastos gengivais humanos e células de ligamento periodontal. Em outro estudo que determinou a correlação da citotoxicidade com a estrutura molecular de monômeros, Yoshii⁶⁸, em 1997, analisou o efeito de seis dimetacrilatos, entre eles o 1,6 – HDMA, na viabilidade celular relativa de células HeLa S3. Eles observaram que esses dimetacrilatos apresentaram grande variação nos valores de IC 50, entre 0,03 e 3,61 mmol/L. Essa variação foi correlacionada com as diferentes estruturas moleculares localizadas entre os grupos metacrilatos, que podem ter um papel importante no efeito citotóxico de dimetacrilatos. Similar ao que foi considerado para o monômero IBMA, o log P (3,31)⁶⁸ e o tempo de retenção (17 min)⁶² do monômero 1,6 – HDMA também podem ter contribuído para sua intensa citotoxicidade sobre as células L929.

O plastificante DBP foi intensamente citotóxico e reduziu a atividade mitocondrial das células L929 e a síntese de DNA em, aproximadamente, 70 a 100%. A única exceção foi à menor concentração (0,31 µg/mL), que induziu discreta citotoxicidade quando mensurada pelo teste de MTT e ³H - timidina. Vários estudos avaliaram a atividade do potencial estrogênico dos ftalatos^{18,24}; entretanto, existem poucos estudos sobre sua citotoxicidade. Kim et al.²⁹, em 2002, verificaram a citotoxicidade do DBP e seu produto metabólico mono-n-butil ftalato (MBuP) em cultura de células embrionárias de ratos, e observaram que o DBP foi mais citotóxico

que o MBuP. Esses resultados foram correlacionados com a polaridade relativamente alta do MBuP em relação ao DBP. A alta polaridade do MBuP pode ter reduzido sua penetração nas células e interação com os locais específicos de ação. A alta citotoxicidade do DBP observada no presente estudo sugere que baixa polaridade pode aumentar o efeito tóxico. Tem sido relatado, também, que os fatalatos são lipofílicos²⁴. Como discutido para os monômeros IBMA e 1,6 – HDMA, a lipofilicidade também parece ser um fator importante na citotoxicidade dos plastificantes.

Para todas as concentrações, o produto de degradação AM reduziu a proliferação das células L929 em aproximadamente 100% enquanto a atividade mitocondrial foi reduzida entre 40 a 70%. O AM tem sido identificado como o principal produto de degradação de diferentes monômeros, como o TEGMA, 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) e o MMA, que são comumente utilizados em vários materiais odontológicos e polímeros de alto peso molecular^{14,30,41,51}. Tem sido relatado que lesões no epitélio oral nasal de ratos foram causadas pelo metabolismo do MMA em AM, um metabólito irritante e corrosivo⁴¹. Estudos com cultura celular têm demonstrado diferentes resultados. Exposição de células embrionárias de camundongos resultou em efeitos embriotóxicos, porém nenhum efeito citotóxico foi observado com o teste de MTT⁵¹. O AM na concentração de 105 µg/ml não apresentou nenhuma citotoxicidade em fibroblastos de pele humana, enquanto na concentração de 470 µg/ml a inibição do crescimento avaliado pela contagem de

células foi baixa. Por outro lado, semelhante ao observado no presente estudo, Emmmler et al.¹⁴, em 2008, observou que o AM induziu perda de viabilidade celular em células pulmonares humanas expostas a esse produto. Por causa da estrutura alílica, o AM pode formar moléculas altamente reativas (epóxidos) que podem contribuir para os efeitos citotóxicos observados^{14,52}. Um desses epóxidos, o 2,3 – epóxi metacrílico ácido (2,3 – EMA), pode sofrer novas reações com macromoléculas como o DNA e o RNA⁵².

Tem sido observado que o peróxido de benzoíla (PB) é 250 vezes mais citotóxico para as células RHEK-1 que o AB⁴. Estudos têm demonstrado que a toxicidade do PB está relacionada com a geração de metabólitos (radicais livres), como benzoiloxi e radicais fenil^{13,56}. Por outro lado, o AB, que é o produto de degradação final e mais estável do PB^{4,13,56}, não causou nenhuma alteração significativa na síntese de lipídios¹³ e não produziu danos no DNA⁵⁶. No presente estudo, entretanto, foi observado que a incorporação do ³H - timidina foi reduzida, indicando que o AB influencia a proliferação celular. Os resultados do teste de MTT indicaram que o AB foi citotóxico em poucas concentrações testadas. Esses resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Datar et al.¹³, em 2004, que observaram que o AB não afetou a viabilidade celular quando avaliado por um método colorimétrico.

Em geral, a síntese de DNA foi mais afetada pelos compostos testados que a atividade mitocondrial das células L929. Tem sido afirmado que a capacidade

das células de se recuperarem de injúrias aos mecanismos de síntese de DNA é menor, o que pode resultar em diminuição na taxa de reprodução celular e, como consequência, em mucosa mais delgada^{6,34}. Isso é particularmente importante no caso da técnica de reembasamento imediato, na qual o material reembasador mantém contato direto com o tecido da cavidade oral.

O resultado do presente estudo demonstrou que as concentrações máximas dos produtos de degradação AM e AB liberadas pelos materiais reembasadores NT, K e U, verificado em estudo anterior⁶¹, foram altamente citotóxicas (³H – timidina), mesmo após 7 a 30 dias de imersão em saliva artificial⁶¹. Quando os materiais reembasadores foram submetidos a tratamento de pós-polimerização, por meio da imersão em água a 55° C por 10 min, redução significativa na liberação de AB foi observada⁶¹. Apesar dessa redução, as quantidades de AB liberadas a partir das resinas para reembasamento, mesmo após 14 a 30 dias de imersão, foram moderadamente citotóxicas. Para o AM, os valores máximos liberados dos materiais reembasadores, no período de 30 dias de imersão, apresentaram-se intensamente citotóxicos para as células L929.

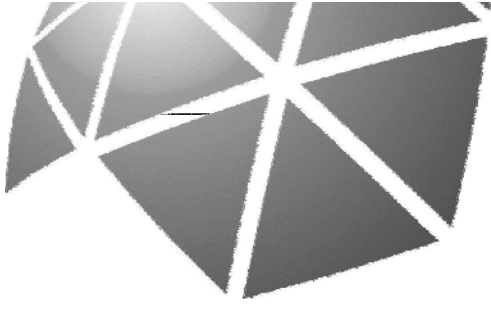
A concentração máxima liberada de DBP pela resina para reembasamento NT, nas primeiras 5 horas após polimerização, verificada no estudo de Urban et al., em 2009⁶³, foi intensamente citotóxica. Com o aumento do tempo de imersão, por até 24 horas, a concentração máxima liberada pelos corpos-de-prova da resina NT foi levemente citotóxica. Por outro lado, os valores máximos de liberação a

partir de corpos-de-prova da resina NT submetidos ao tratamento de pós-polimerização⁶³, nas primeiras 5 horas, apresentaram-se na mesma faixa de concentração que foi discretamente citotóxica.

Foi observado também que as quantidades do monômero 1,6 - HDMA liberadas pelo reembasador U em saliva artificial até 7 dias de imersão quantificada por Urban et al., em 2009⁶³, foram altamente citotóxicas. Resultados similares foram obtidos com as concentrações máximas liberadas pelos corpos-de-prova da resina U submetidos ao tratamento de pós-polimerização. Para o monômero IBMA, os valores liberados a partir das resinas K e NT até o período de 3 dias de imersão em saliva artificial, observado no mesmo estudo de Urban et al., em 2009⁶³, foram intensamente citotóxicos. Quando esses materiais foram submetidos ao tratamento de pós-polimerização, não houve liberação de IBMA após 24 horas (K) e 3 dias de imersão (NT)⁶³; porém, as concentrações máximas liberadas até o período de 24 horas, ainda apresentaram intenso efeito citotóxico sobre as células L929.

Os resultados deste estudo demonstraram que todos os componentes avaliados podem ter sido responsáveis pelo efeito citotóxico de resinas para reembasamento previamente observado *in vitro*⁸. Em geral, todos os compostos demonstraram vários níveis de citotoxicidade, principalmente na proliferação celular. Além disso, com exceção do DBP, as quantidades máximas liberadas de monômeros e produtos de degradação pelas resinas reembasadoras após tratamento de pós-polimerização por imersão em água aquecida, ainda apresentaram efeitos tóxicos

sobre as células L929. Deve ser enfatizado, entretanto, que a implicação clínica de resultados obtidos em cultura celular deve ser realizada com cautela. A camada de mucina e queratina pode tornar a mucosa oral mais resistente às substâncias tóxicas que as culturas celulares. Apesar disso, a identificação dos compostos responsáveis pelo efeito tóxico pode contribuir para o desenvolvimento de materiais reembasadores mais biocompatíveis.



CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

1. O monômero IBMA apresentou-se intensamente citotóxico, com exceção da menor concentração avaliada (0,78 µg/mL) que se apresentou discretamente (³H – timidina) e não-citotóxica (MTT).
2. Para todas as concentrações avaliadas, o monômero 1,6 – HDMA foi classificado como intensamente citotóxico; a única exceção foi a concentração de 0,31 µg/mL que foi discretamente citotóxica no teste MTT.
3. Nos dois testes de citotoxicidade empregados, o plastificante DBP foi intensamente citotóxico, com exceção da menor concentração avaliada (0,31 µg/mL) que se apresentou moderadamente citotóxica (³H – timidina) e discretamente citotóxica (MTT).
4. No teste de ³H – timidina, os produtos de degradação AM e AB, em todas as concentrações avaliadas, foram classificados como intensamente e moderadamente citotóxico, respectivamente. Para o teste MTT, todas as concentrações avaliadas foram classificadas como moderadamente citotóxicas para o AM e não-citotóxicas para a maioria das concentrações do AB.
5. O teste da incorporação de ³H – timidina foi mais sensível do que o teste MTT na detecção dos efeitos citotóxicos dos compostos testados.



REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Ali A, Bates JF, Reynolds AJ, Walker DM. The burning mouth sensation related to the wearing of acrylic dentures: an investigation. *Br Dent J.* 1986; 161:444-7.
2. Arima T, Murata H, Hamada T. Analysis of composition and structure of hard autopolymerizing reline resins. *J Oral Rehabil.* 1996; 23:346-52.
3. Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. (Meth)acrylate monomer-induced cytotoxicity and intracellular Ca(2+) mobilization in human salivary gland carcinoma cells and human gingival fibroblast cells related to monomer hydrophobicity. *Biomaterials.* 2006; 57:5794–800.
4. Babich H, Zuckerbraun HL, Wurzburger BJ, Rubin YL, Borenfreund E, Blau L. Benzoyl peroxide cytotoxicity evaluated in vitro with the human keratinocyte cell line, RHEK-1. *Toxicology.* 1996; 106:187-96.
5. Baker S, Brooks SC, Walker DM. The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: An assay for monomer in saliva. *J Dent Res.* 1988; 67:1295-9.

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)

6. Barron DJ, Schuster GS, Caughman GB, Lefebvre CA. Biocompatibility of visible light-polymerized denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1993;6:495-501.
7. Bohnenkamp DV. Traumatic stomatitis following an intraoral denture reline: a clinica report. *J Prosthet Dent.* 1996; 76:113-4.
8. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of hard chairside reline resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont.* 2006; 19:195-201.
9. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjerstsen BT, et al. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108:59-69.
10. Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT, et al. The effect of heat- and auto- polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand.* 2000; 58:217-28.
11. Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. *In vitro* biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology.* 2006; 23:17-22.

12. Danilewicz-Stysiak Z. Experimental investigations on the cytotoxic nature of methyl methacrylate. *J Prosthet Dent.* 1980; 44:13-6.
13. Datar R, Rueggeberg FA, Caughman GB, Wataha JC, Lewis J, Schuster GS. Effects of subtoxic concentrations of benzoyl peroxide on cell lipid metabolism. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 71:685-92.
14. Emmler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K. Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater.* 2008; 24:1670-5.
15. Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. ^1H and ^{13}C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res.* 1988; 67:1438-41
16. Giunta JL, Grauer I, Zablotzky N. Allergic contact stomatitis caused by acrylic resin. *J Prosthet Dent.* 1979; 42:188-90.
17. Gonçalves TS, Morganti MA, Campos LC, Rizzato SM, Menezes LM. Allergy to auto-polymerized acrylic resin in an orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 129:431-5.

18. Hashimoto Y, Moriguchi Y, Oshima H, Nishikawa J, Nishihara T, Nakamura M. Estrogenic activity of chemicals for dental and similar use in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2000; 11:465-8
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, Wictorin L. The cytotoxic effect of denture base polymers. *Acta Odontol Scand.* 1981; 39:101-6.
21. 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.
22. Imazato S, Horikawa D, Nishida M, Ebisu S. Effects of monomers eluted from dental resin restoratives on osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 88:378-86.
23. International Standards Organization. ISO 10993-5: Biologic,al evaluation of medical devices – part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISSO; 1999.
24. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate

- plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.* 1995; 103:582-7.
25. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent.* 2003; 90:190-3.
26. 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.
27. Kawahara T, Nomura Y, Tanaka N, Teshima W, Okazaki M, Shintani H. Leachability of plasticizer and residual monomer from commercial temporary restorative resins. *J Dent.* 2004; 32:277-83.
28. Kedjarune U, Charoenworalluk N, Koontongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J.* 1999; 44:25-30.
29. Kim SH, Kim SS, Kwon O, Sohn KH, Kwack SJ, Choi YW, et al. Effects of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate on cytotoxicity and differentiation in cultured rat embryonic limb bud cells; protection by antioxidants. *J Toxicol Environ Health A.* 2002; 65:461-72.

30. 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.
31. 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.
32. Lee SY, Lai YL, Hsu TS. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110:179-83.
33. Lefebvre CA, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *J Prosthet Dent.* 1994; 71:178-85.
34. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent.* 1994; 72:644-50.
35. Lefebvre CA, Schuster GS, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1995; 8:122-8.
36. Lefebvre CA, Shuster GS, Richardson DW, Barron DJ. The cytotoxic effects of denture base resin sealants. *Int J Prosthodont.* 1992; 5:558-62.

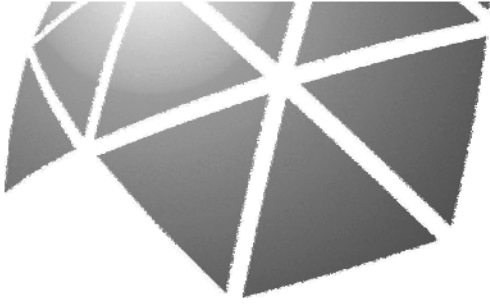
37. Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. *J Prosthet Dent.* 2001; 85:352-6.
38. Lunder T, Rogl-Butina M. Chronic urticaria from an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis.* 2000; 43:232-3.
39. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching from denture base materials in vitro. *Acta Odontol Scand.* 1995; 53:75-80.
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. Mainwaring G, Foster JR, Lund V, Green T. Methyl methacrylate toxicity in rat nasal epithelium: studies of the mechanism of action and comparisons between species. *Toxicology.* 2001; 158:109-18.
42. Matsumura H, Tanoue N, Kawasaki K, Atsuta M. Clinical evaluation of a chemically cured hard denture relining material. *J Oral Rehabil.* 2001; 28:640-4.
43. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mat.* 2007; 23:40-4.

44. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65:55-63.
45. Okita N, Hensten-Pettersen A. In vitro cytotoxicity of tissue conditioners. *J Prosthet Dent*. 1991; 66:656-9.
46. Reis JM, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL. Effect of relining, water storage and cyclic loading on the flexural strength of a denture base acrylic resin. *J Dent*. 2006; 34:420-6.
47. Ruyter IE. Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand*. 1980; 38:17-27.
48. Sadamori S, Kotani H, Hamada T. The usage period of denture and their residual monomer contents. *J Prosthet Dent*. 1992; 68:374-6.
49. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. *J Dent*. 1994; 2:6-11.
50. Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB. Relationships between denture base resin, cytotoxicity and cell lipid metabolism. *Int J Prosthodont*. 1995; 8:580-6.

51. Schwengberg S, Bohlen H, Kleinsasser N, Kehe K, Seiss M, Walther UI, et al. In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials. *J Dent.* 2005; 33:49-55.
52. Seiss M, Nitz S, Kleinsasser N, Buters JT, Behrendt H, Hickel R. Identification of 2,3-epoxymethacrylic acid as an intermediate in the metabolism of dental materials in human liver microsomes. *Dent Mater.* 2007; 23:9-16.
53. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1997; 10:73-7.
54. Silikas N, Watts DC. High pressure liquid chromatography of dentin primers and bonding agents. *Dent Mater.* 2000; 16:81-8.
55. 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.
56. Swauger JE, Dolan PM, Zweier JL, Kuppusamy P, Kensler TW. Role of the benzoyloxyl radical in DNA damage mediated by benzoyl peroxide. *Chem Res Toxicol.* 1991; 4:223-8
57. Tang ATH, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: Methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res.* 1999; 45:214-22.

58. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater.* 2002; 18:318-23.
59. Tsuchiya H, Hoshino Y, Kato H, Takagi N. Flow injection analysis of formaldehyde leached from denture-base acrylic resins. *J Dent.* 1993; 21:240-3.
60. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent.* 1994; 71:618-24.
61. Urban VM. Efeito de tratamento pós-polimerização sobre o peso molecular, grau de conversão, temperatura de transição vítrea e liberação in vitro de monômero residual, plastificante e produtos de degradação de resinas acrílicas para reembasamento imediato [Tese doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.
62. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater.* 2007; 23:363-8.
63. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, 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 reline resins. *Dent Mater.* 2009 Jan 8. [Epub ahead of prin].
64. 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.
65. Weaver R, Goebel WM. Reactions to acrylic resin dental prostheses. *J Prosthet Dent.* 1980; 43:138-42.
66. Wennberg A. In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials - the millipore filter method. *Int Endod J.* 1988; 22:67-71.
67. Xiang-Rong X, Huan-Bin L, Ji-Dong G, Xiao-Yan L. Kinetics of n-butyl benzyl phthalate degradation by a pure bacterial culture from the mangrove sediment. *J Hazardous Mat.* 2007; 140:194-9.
68. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.* 1997; 37:517-24.



APÊNDICES

9 APÊNDICE

APÊNDICE A

Resultados do teste de ^3H - timidina, contagem de células viáveis, em cintilação por minuto (cpm).

Tabela 1 A - Resultados do DBP

Repetições	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)								Controle
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	DMSO
1	110	84	315	211	640	1343	1743	4944	6477
2	76	90	105	15726	543	1509	1477	2913	6726
3	63	71	75	139	656	921	1561	3626	5131
4	79	113	398	103	518	1143	2965	3129	4914
5	121	84	589	142	1074	1453	1742	2838	19307
Resposta	89,8	88,4	351,8	148,8	686,2	1273,8	1897,6	3490,0	5812,0
Dp	24,5	15,4	200,6	45,1	224,9	241,8	607,8	869,0	921,6
IC(95%)	30,5	19,1	319,1	71,8	279,2	300,2	754,7	1079,1	1466,4

Tabela 2 A - Resultados do IBMA

Repetições	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)									Controle
	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	DMSO
1	402	452	523	783	752	974	982	1445	5343	4070
2	844	281	238	297	1509	1199	927	2890	4307	5924
3	680	346	717	233	284	1051	1351	2316	5678	8470
4	428	503	338	274	291	291	2144	2932	5504	8845
5	474	346	399	273	611	611	710	3192	5483	7705
Resposta	565,6	385,6	443,0	372,0	689,4	825,2	1222,8	2555,0	5263,0	7002,8
Dp	190,2	89,8	184,7	230,9	501,2	368,8	564,2	698,1	547,5	1987,7
IC(95%)	236,1	111,5	229,3	286,7	622,3	457,9	700,6	866,8	679,8	2468,1

Tabela 3 A - Resultados do 1,6 – HDMA

Repetições	Concentrações (µg/mL)						Controle DMSO
	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	
1	27	22	49	46	32	343	3904
2	39	42	80	62	40	135	3406
3	46	33	69	33	28	86	3869
4	40	72	29	43	61	150	3114
5	94	129	62	82	62	82	3211
Resposta	49,2	59,6	57,8	53,2	44,6	159,2	3500,8
Dp	26,0	43,0	19,6	19,2	16,0	107,0	367,7
IC(95%)	32,3	53,4	24,4	23,8	19,9	132,8	456,5

Tabela 4 A - Resultados do AM

Repetições	Concentrações (µg/mL)							Controle DMSO
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	
1	19	21	26	20	33	21	161	3690
2	25	20	24	29	40	37	174	6339
3	24	25	32	38	37	42	159	7303
4	37	28	36	37	35	33	232	8054
5	26	35	55	52	37	28	234	5612
Resposta	26,2	25,8	34,6	35,2	36,4	32,2	192,0	6346,5
Dp	6,6	6,1	12,4	11,9	2,6	8,1	37,9	1905,0
IC(95%)	8,2	7,5	15,3	14,7	3,2	10,1	47,0	3031,3

Tabela 5 A - Resultados do AB

Repetições	Concentrações (µg/mL)								Controle
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	L929
1	1596	1548	1902	2154	1519	1469	2299	1787	5214
2	1914	2101	2680	2064	2756	2192	2151	2495	4685
3	1684	2332	2663	2497	2957	2428	2057	3039	7866
4	2059	1466	2330	2952	2369	2763	1846	2941	5582
5	2321	1104	2119	3391	3049	2977	1876	3426	6537
Resposta	1914,8	1710,2	2338,8	2611,6	2530,0	2365,8	2045,8	2737,6	5976,8
Dp	291,8	498,2	339,4	558,1	622,7	585,2	189,8	626,2	1253,9
IC(95%)	362,4	618,6	421,4	692,9	773,1	726,6	235,6	777,6	1557,0

APÊNDICE B

Resultados do teste de MTT, pelos valores de absorbância calculados pelas diferenças entre os valores obtidos nos comprimentos de onda 540 e 620 nm, obtendo-se a atividade mitocondrial das células vivas.

Tabela 1 B - Resultados do DBP

Repetições	Concentrações (µg/mL)								Controle
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	DMSO
1	0,012	0,010	0,008	0,007	0,009	0,009	0,008	0,030	0,035
2	0,008	0,013	0,010	0,008	0,006	0,008	0,008	0,030	0,038
3	0,008	0,012	0,006	0,006	0,006	0,009	0,009	0,027	0,036
4	0,008	0,020	0,008	0,006	0,006	0,008	0,009	0,037	0,037
5	0,011	0,006	0,019	0,006	0,007	0,008	0,009	0,028	0,034
6	0,011	0,008	0,006	0,006	0,006	0,012	0,006	0,027	0,026
Resposta	0,0097	0,0116	0,0076	0,0068	0,0067	0,0090	0,0082	0,0283	0,0343
Dp	0,0018	0,0048	0,0018	0,0008	0,0010	0,0017	0,0011	0,0016	0,0044
IC(95%)	0,0019	0,0051	0,0023	0,0009	0,0011	0,0018	0,0011	0,0020	0,0047

Tabela 2 B - Resultados do IBMA

Repetições	Concentrações (µg/mL)									Controle
	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	DMSO
1	0,014	0,024	0,022	0,019	0,029	0,024	0,029	0,021	0,320	0,143
2	0,023	0,019	0,017	0,018	0,013	0,019	0,030	0,095	0,423	0,241
3	0,024	0,021	0,014	0,016	0,018	0,016	0,018	0,130	0,514	0,489
4	0,022	0,013	0,015	0,014	0,023	0,014	0,018	0,086	0,613	0,511
5	0,015	0,020	0,017	0,020	0,015	0,015	0,015	0,018	0,603	0,497
6	0,025	0,015	0,014	0,016	0,018	0,014	0,022	0,150	0,469	0,411
Resposta	0,020	0,019	0,017	0,017	0,019	0,017	0,022	0,083	0,490	0,382
Dp	0,005	0,004	0,003	0,002	0,006	0,004	0,006	0,055	0,111	0,154
IC(95%)	0,005	0,004	0,003	0,002	0,006	0,004	0,006	0,057	0,117	0,162

Tabela 3 B - Resultados do 1,6 – HDMA

Repetições	Concentrações (µg/mL)						Controle
	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	DMSO
1	0,013	0,010	0,009	0,008	0,022	0,0186	0,056
2	0,008	0,008	0,008	0,007	0,018	0,070	0,062
3	0,006	0,011	0,011	0,007	0,021	0,048	0,068
4	0,008	0,008	0,008	0,008	0,0564	0,071	0,080
5	0,007	0,008	0,010	0,011	0,016	0,040	0,071
6	0,0170	0,005	0,007	0,008	0,013	0,049	0,112
Resposta	0,009	0,009	0,009	0,008	0,018	0,056	0,075
Dp	0,002	0,002	0,001	0,002	0,004	0,014	0,020
IC(95%)	0,003	0,002	0,001	0,002	0,005	0,017	0,021

Tabela 4 B - Resultados do AM

Repetições	Concentrações (µg/mL)							Controle
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,78	DMSO
1	0,010	0,012	0,011	0,011	0,009	0,007	0,013	0,008
2	0,007	0,011	0,015	0,013	0,008	0,008	0,0339	0,006
3	0,009	0,011	0,009	0,009	0,007	0,009	0,009	0,007
4	0,009	0,011	0,008	0,009	0,007	0,009	0,006	0,039
5	0,013	0,010	0,011	0,012	0,009	0,008	0,009	0,044
6	0,008	0,012	0,010	0,015	0,009	0,008	0,010	0,040
Resposta	0,010	0,011	0,011	0,012	0,008	0,008	0,009	0,024
Dp	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	0,019
IC(95%)	0,002	0,001	0,003	0,002	0,001	0,001	0,003	0,020

Tabela 5 B - Resultados do AB

Repetições	Concentrações (µg/mL)								Controle
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	DMSO
1	0,113	0,114	0,119	0,127	0,125	0,125	0,0044	0,115	0,103
2	0,108	0,105	0,108	0,113	0,112	0,105	0,0424	0,123	0,105
3	0,106	0,102	0,098	0,099	0,111	0,120	0,090	0,110	0,118
4	0,085	0,084	0,080	0,086	0,085	0,085	0,067	0,153	0,103
5	0,078	0,081	0,069	0,081	0,069	0,101	0,092	0,150	0,102
6	0,123	0,117	0,115	0,090	0,097	0,120	0,061	0,135	0,107
Resposta	0,102	0,100	0,098	0,099	0,100	0,109	0,078	0,131	0,106
Dp	0,017	0,015	0,020	0,017	0,020	0,015	0,016	0,018	0,006
IC(95%)	0,018	0,016	0,021	0,018	0,021	0,016	0,025	0,019	0,006

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

Araraquara, 17 de Abril de 2009.

CAROLINA DE ANDRADE LIMA CHAVES