



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**ANDRESSA ROSA PERIN LEITE**

**ANÁLISE IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E PRODUÇÃO DE MEDIADORES  
INFLAMATÓRIOS POR QUERATINÓCITOS ESTIMULADOS POR ADESIVOS  
PARA PRÓTESE**

**Araraquara**

**2017**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**ANDRESSA ROSA PERIN LEITE**

**ANÁLISE IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E PRODUÇÃO DE MEDIADORES  
INFLAMATÓRIOS POR QUERATINÓCITOS ESTIMULADOS POR ADESIVOS  
PARA PRÓTESE**

Tese 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 Doutor em Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Pero

**Araraquara**

**2017**

Leite, Andressa Rosa Perin

Análise in vitro da citotoxicidade e produção de mediadores inflamatórios por queratinócitos estimulados por adesivos para prótese / Andressa Rosa Perin Leite.-- Araraquara: [s.n.], 2017

70 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Pero

1. Prótese total 2. Adesivos 3. Teste de materiais 4. Citocinas I. Título

**ANDRESSA ROSA PERIN LEITE**

**ANÁLISE IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E PRODUÇÃO DE MEDIADORES  
INFLAMATÓRIOS POR QUERATINÓCITOS ESTIMULADOS POR ADESIVOS  
PARA PRÓTESE**

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor

Presidente e Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Pero

2º Examinador: Prof. Dr. André Gustavo Paleari

3º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karin Hermana Neppelenbroek

4º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. João Neudenir Arioli Filho

5º Examinador: Prof. Dr. Marco Antonio Compagnoni

Araraquara, 31 de janeiro de 2017

## **DADOS CURRICULARES**

ANDRESSA ROSA PERIN LEITE

Nascimento	06.10.1988 – Itararé/SP, Brasil
Filiação	José Luiz Perin Leite Zenite Aparecida Rosa Perin Leite
2006/2010	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2011/2013	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2013/2017	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

## Dedicatória

Dedico este trabalho,

à **Deus**.

Aos meus pais **José Luiz e Zenite**, por todo amor, dedicação e incentivo, tudo que sou hoje devo a vocês.

Ao meu irmão **Daniel**, parte fundamental da minha vida, meu melhor amigo.

À minha avó **Paulina**, por todo amor, preocupação e incentivo.

Aos meus avôs **Francisco e João** e à minha avó **Kota**, que teriam orgulho, se estivessem aqui, de ver o caminho que segui.

Todos meus **tios e primos** que sempre me incentivaram.

Às minhas amigas desde a infância **Camila, Karina, Laís e Natalia**, que apesar da distância a amizade e o carinho continuam.

À minha amiga **Mônica**, por todos esses anos que moramos juntas e por todos os momentos que passamos e a querida amiga **Jéssica**, por todos os momentos de descontração.

Às amigas que fiz na faculdade **Aline, Belisa, Sarah, Tarsila e Vivian**, com vocês passei anos inesquecíveis e aprendi muito com cada uma.

À toda a família do meu namorado Victor, que sempre me receberam com muito carinho. Em especial aos avós **Shigue e Fernando**, à minha sogra **Edna**, ao meu sogro **Tatsunobo**, meus cunhados **Sarah e Vinícius** e minha concunhada **Marcela**.

Ao meu amor, namorado, amigo e confidente **Victor**.

## **Agradecimentos Especiais**

À minha querida orientadora **Prof. Dr. Ana Carolina**, pelos muitos ensinamentos, por estar sempre presente, pela contribuição para meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional.

Ao querido **Prof. Dr. Marco**, um exemplo de pesquisador, sempre muito atencioso e preocupado em nos fazer crescer.

Aos meus queridos amigos, **Danny e Gabi**, pela companhia de quase todos os dias, por compartilharem seus conhecimentos comigo, pela extrema disponibilidade em ajudar sempre que precisei. Obrigada por estarem sempre comigo e tornarem meus dias mais alegres.

Vou sentir muita saudade!

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)**, pelo suporte financeiro (bolsa de doutorado e taxa de bancada #158672/2013-5), que tornou possível a realização deste trabalho.

## **Agradecimentos**

À **Paula Aboud Barbugli**, técnica do laboratório de Cultivo Celular, por todo o conhecimento e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À aluna de doutorado **Kahena Soldati** pela disponibilidade e disposição em ajudar em parte da metodologia deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior (FOAR-UNESP)** e ao **Prof. Dr. Rogério M. Castilho (University of Michigan)** por terem cedido as células NOK-SI que foram utilizadas neste trabalho.

A **Prof. Dr. Janaina Habib Jorge** pela contribuição na metodologia deste trabalho.

Ao técnico do Departamento de Química Orgânica **Alberto Camilo Alécio** pela contribuição em parte da metodologia deste trabalho.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa e da Pós-graduação, **André, Norberto, Vivian, Priscila, Kássia e Fernanda Alves**, pela convivência, amizade, conselhos e ensinamentos.

Aos queridos professores da disciplina de Prótese total, **João, Kiko e Serginho** por todos esses anos de convivência, por todo conhecimento e experiências compartilhadas.

A **todos os professores** do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela convivência, experiências compartilhadas e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desses anos.

A todos os **funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese** da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

A todos os **funcionários da Seção de Pós-Graduação**, pela atenção e ajuda sempre que precisei.

A **todos**, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho!

**Vou levar um pouquinho de cada um de vocês comigo, no meu coração!**

**Muito Obrigada!**

Leite ARP. Análise in vitro da citotoxicidade e produção de mediadores inflamatórios por queratinócitos estimulados por adesivos para prótese [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

## **RESUMO**

Subprodutos oriundos de adesivos utilizados para retenção e estabilidade de próteses totais podem atuar como irritantes quando em contato com a mucosa. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e a produção de mediadores inflamatórios por queratinócitos estimulados por diferentes adesivos para próteses totais. Três adesivos disponíveis comercialmente foram testados (Ultra Corega creme, Corega pó Fixador Ultra e Corega fita adesiva). Foram obtidos extratos na concentração de 1% para os adesivos tipo creme, pó e fita. Queratinócitos gengivais humanos (NOK-SI) foram cultivados in vitro e expostos por 3, 6 e 24 horas aos extratos. Após este período, a citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo ensaio metil tetrazólio (MTT) e análise da integridade da membrana (liberação de LDH; Kit CytoTox-One) e pela análise da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  foi realizada por meio do ensaio Elisa. A presença de ácido maleico e formaldeído nos adesivos foi verificada por meio de cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística realizada ao nível de significância de 5%. Os adesivos tipo creme (71,6% de viabilidade celular, ligeiramente citotóxico,  $p=0,000$ ) e pó (75,7%, não citotóxico,  $p=0,002$ ) alteraram significativamente a viabilidade celular quando comparados ao controle negativo no período 6 horas. Não foram observadas diferenças significativas entre os adesivos e o controle negativo ( $p > 0,05$ ) na análise da integridade da membrana. A morfologia celular dos queratinócitos expostos aos extratos dos adesivos mostraram-se semelhantes ao controle negativo. Maior liberação da citocina IL-6 foi observada para os adesivos tipo creme e pó nos períodos 6 e 24h ( $p < 0,05$ ). No período 3 horas, maior liberação de IL-1 $\beta$  pôde ser observada para o adesivo fita ( $p=0,016$ ). Foi detectada, em diferentes níveis, a presença de ácido maleico e formaldeído em todos os adesivos testados. Sendo assim, de acordo com as limitações do presente estudo, é possível concluir que a similaridade entre os resultados de citotoxicidade dos três adesivos avaliados e o controle negativo indicam que esses produtos parecem não apresentar citotoxicidade às células queratinócitos gengivais humanos, apesar de ter sido observado alteração na expressão de citocinas pró-inflamatórias.

**Palavras-chave:** Prótese total. Adesivos. Teste de materiais. Citocinas.

Leite ARP. In vitro analysis of cytotoxicity and production of inflammatory mediators by keratinocytes stimulated by denture adhesives [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

## **ABSTRACT**

Subproducts from denture adhesives used to improve retention and stability of these dentures, in contact with the oral mucosa, can act as an irritant. The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity and production of inflammatory mediators by keratinocytes stimulated by different denture adhesives. Three commercially available adhesives were tested (Ultra Corega cream, Corega powder Fixador Ultra and Corega pad). Extracts were obtained from the adhesive cream, powder and strip at 1% after 24 hours of exposure in DMEM culture medium. Human gingival keratinocytes (NOK-SI) were grown in vitro and exposed for 3, 6 and 24 hours to extracts. After this period, the cytotoxicity of the extracts was evaluated by methyl tetrazolium assay (MTT) and analysis of membrane integrity (LDH release; KIT Cytotox-One) and by analysis of cell morphology by scanning electron microscopy (SEM). It was also evaluated the production of IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  using the Elisa assay. It was also evaluated the presence of maleic acid and formaldehyde in adhesives by means of Gas Chromatography and Flame Ionization Detector. The results were analyzed statistically with a significance level of 5%. Cream (71.6%, slightly cytotoxic,  $p=0.000$ ) and powder denture adhesives (75.7%, non-cytotoxic,  $p=0.002$ ) significantly altered cell viability when compared to the negative control at 6h. No significant differences were observed between the adhesives and the negative control ( $p>0.05$ ) when the analysis of membrane integrity assay was performed. The cellular morphology of keratinocytes exposed to adhesive eluates was similar to control. Greater IL-6 cytokine release was observed for cream and powder denture adhesives at 6h and 24h ( $p<0.05$ ). IL-1 $\beta$  release from strip was higher at 3 hours when compared to the control ( $p = 0.016$ ). The presence of maleic acid and formaldehyde was detected at different levels in all the adhesives tested. Within the limitations of the present study, it be concluded that the similarity between the results of cytotoxicity for the three denture adhesives tested and negative control indicates that these products do not appear to be cytotoxic to human oral keratinocytes, in spite of the changes on expression of pro-inflammatory cytokines.

**Keywords:** Denture complete. Adhesives. Materials Testing. Cytokines.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>3.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>46</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1 Avaliação da Citotoxicidade de Extratos de Diferentes Adesivos para Prótese Total</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1.1 Cultura e manutenção das células</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1.2 Quantificação das células</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1.3 Obtenção dos extratos</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1.4 Avaliação quantitativa MTT</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1.5 Análise da integridade da membrana</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1.6 Avaliação da morfologia celular por MEV</b> .....	<b>51</b>
<b>4.2 Análise da Produção de Citocinas Pró-inflamatórias após Exposição aos Extratos dos Adesivos</b> .....	<b>52</b>
<b>4.3 Identificação de Ácido Maleico e Formaldeído nos Extratos dos Adesivos para Prótese</b> .....	<b>53</b>
<b>4.4 Análise dos Resultados</b> .....	<b>53</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A confecção de próteses totais envolve uma série de procedimentos clínicos e laboratoriais para que se possa obter sucesso no tratamento e satisfação do paciente. Para garantir isso, o cirurgião-dentista deve estar atento a todas as etapas que envolvem a confecção da prótese, a fim de que próteses totais bem adaptadas possam garantir uma reabilitação funcional e estética, preservando as estruturas de suporte, além de proporcionar conforto aos seus usuários.

Dentre os objetivos a serem alcançados quando da confecção de uma prótese total convencional, a retenção e a estabilidade são aspectos de grande interesse por parte de seus usuários, uma vez que estão diretamente relacionados com o seu conforto e segurança<sup>66</sup>. Desta forma, é muito importante garantir aos usuários destas próteses que suas necessidades psicológicas relacionadas à aceitação do tratamento sejam alcançadas.

Entre as alternativas de reabilitação do paciente desdentado, as próteses totais convencionais são financeiramente mais acessíveis quando comparadas as próteses implanto suportadas<sup>22</sup>. Entretanto, apesar de alguns estudos demonstrarem uma alta prevalência de pacientes satisfeitos com as próteses totais convencionais<sup>7,25</sup>, diversas são as queixas relatadas pelos pacientes que fazem uso destas próteses, especialmente mandibulares, tais como falta de retenção, instabilidade, dificuldades de mastigação, baixa autoestima, redução da qualidade de vida, do convívio social e da satisfação<sup>26,50,68,73</sup>. Sabe-se que os principais fatores que podem contribuir para a pobre retenção dessas próteses são o grau de reabsorção do osso alveolar e diminuição do fluxo salivar, além do fato de que as próteses mandibulares exigem um elevado controle do tônus muscular pelo paciente, o qual diminui com o avanço da idade<sup>8,9</sup>. Por estes motivos, os agentes adesivos têm sido utilizados para otimizar a retenção das próteses totais por aumentar as propriedades adesivas e coesivas da saliva e a viscosidade do meio entre a prótese e sua área de assentamento, obliterando o espaço entre a base da prótese e a mucosa bucal<sup>23</sup>. Além disso, os adesivos aumentam o coeficiente de tensão superficial do filme de saliva entre a prótese e a mucosa, proporcionando uma melhor distribuição das forças oclusais<sup>34</sup>.

Desde o final do século XVIII os adesivos têm sido utilizados para melhorar a retenção das próteses, sendo que o primeiro relato científico sobre os adesivos ocorreu em 1935 pelo Council of Dental Materials da American Dental Association<sup>34</sup>. Em 1939, um crescente aumento de usuários pôde ser observado, cerca de 15 milhões de pessoas já faziam

uso de fixadores para prótese<sup>34,61</sup>. Sabe-se que 30% dos usuários de próteses totais usam ou já fizeram uso de adesivos, e que o número de usuários de adesivos varia entre 15 a 33% dos usuários de próteses e que no período de um ano foram vendidos nos Estados Unidos cerca de 55 milhões de unidades de adesivos para prótese, representando um valor superior a 220 milhões de dólares<sup>14</sup>. No Brasil não há dados referentes ao número de pacientes que utilizam esses produtos<sup>60</sup>, mas um estudo recente constatou que 77,5% dos pacientes informaram que o adesivo não era necessário, 3,75% relataram não ter dinheiro para comprar o produto, e apenas 4% utilizavam esse tipo de produto regularmente<sup>64</sup>.

A partir do surgimento desses produtos no mercado, por muito tempo os dentistas foram relutantes em indicá-los aos seus pacientes pelo fato de enxergá-los como um reflexo negativo de suas capacidades clínicas ou pela falta de experiência protética, além disso alguns acreditavam que estes produtos poderiam levar a efeitos indesejáveis como hiperplasias dos tecidos moles e reabsorção do rebordo alveolar<sup>7,22,25,26,68</sup>. De fato, isso pode ser resultado de uma posição histórica tradicional, assumida e mantida ainda hoje por muitas Escolas de Odontologia, afirmando que os adesivos seriam usados unicamente em próteses mal confeccionadas pelos cirurgiões dentistas<sup>74</sup>.

Por outro lado, há uma conduta que defende o uso de adesivos para facilitar procedimentos clínicos, melhorar a aceitação e a satisfação do paciente em relação à prótese, o que torna prudente a indicação destes produtos a usuários de próteses bem adaptadas, a fim de atender suas necessidades funcionais e psicológicas de retenção e estabilidade, o que poderia proporcionar seu melhor desempenho<sup>12</sup>. Além disso, os adesivos também podem ser indicados para pacientes com fluxo salivar reduzido, pobre tonicidade muscular, deficiências neurológicas, melhorar a segurança para pessoas socialmente ativas, facilitar a adaptação de próteses novas e para aqueles que se submeteram a modificações cirúrgicas traumáticas<sup>12,33,34,74,78</sup>. Entretanto, esses produtos tornam-se contraindicados em alguns casos, como em pós operatório de prótese total imediata, pois podem obliterar o alvéolo cirúrgico e impedir a formação de coágulo, em casos que as próteses totais estão insatisfatórias e também na presença de hiperplasias ou patologias da cavidade bucal<sup>34</sup>.

Estudos demonstram que os adesivos podem beneficiar os usuários de próteses melhorando sua adaptação, conforto, função e capacidade mastigatória e o nível de confiança dos pacientes<sup>13,14,33</sup>. Grasso et al.<sup>33</sup> afirmam que as vantagens relacionadas ao uso de adesivos para usuários de próteses totais incluem melhora na função, maior retenção e estabilidade, aumento na força de mordida incisal e sensação de conforto físico e psicológico para o paciente. Outras pesquisas revelaram melhora na eficiência mastigatória e na estabilidade de

próteses com o uso de adesivos e aumento da satisfação de seus usuários<sup>46,66</sup>.

Como não existem evidências na literatura dos efeitos dos adesivos nos tecidos de suporte quando utilizados por períodos superiores a seis meses<sup>27</sup>, recomenda-se que eles não devam ser utilizados sem orientação de um cirurgião-dentista, dessa forma consultas periódicas devem ser realizadas para avaliação das próteses e dos tecidos de suporte<sup>34</sup>.

Na literatura ainda existem controvérsias com relação aos adesivos, como a quantidade insuficiente de evidências de que os adesivos podem melhorar a função mastigatória<sup>27</sup>, e também quanto a sua influência na microbiota bucal<sup>44,51,60,62,67,70,84</sup>.

Os componentes responsáveis pelas propriedades adesivas podem ser de origem vegetal (gomas de Karaya e Acácia) ou sintéticos (polímeros, como metilcelulose, hidroximetilcelulose, acrilamida e polivinil acético)<sup>23</sup>. Também são adicionados aos adesivos agentes inativos para facilitar sua administração, como aromatizantes (óleo de hortelã), agentes umectantes (lauril sulfato de sódio, óleo mineral e vaselina), partículas de carga (óxido de magnésio, fosfato de sódio, silicato de cálcio) conservantes e corantes<sup>2</sup>.

Determinar o comportamento biológico de materiais odontológicos é um aspecto de interesse para pesquisadores pois esses produtos entram em íntimo contato com a mucosa bucal. Além disso, substâncias liberadas na saliva, a partir desses produtos, poderiam causar reações adversas como vesículas, úlceras, sensação de queimação, irritação e vermelhidão da mucosa bucal<sup>54,57,85</sup>. Assim, um adesivo considerado ideal não deve promover o aparecimento de reações adversas na mucosa bucal, não deve ser tóxico nem irritante e deve ser biocompatível<sup>2</sup>.

No estudo de Ekstrand et al.<sup>23</sup>, em 1993, uma determinação semiquantitativa de formaldeído presente em adesivos para prótese foi realizada e foi observado que quatro marcas comerciais de adesivos continham mais de 5 µL/ml de formaldeído, indicando que este componente foi adicionado intencionalmente aos produtos. Tem sido observado na literatura que este componente exibe um elevado nível de citotoxicidade e é responsável por inflamações alérgicas em pacientes que utilizam próteses totais<sup>23,42,69</sup>. Al et al.<sup>3</sup>, em 2005, verificou por meio do ensaio MTT e difusão em ágar, que um dos adesivos testados apresentou efeito citotóxico severo em células da linhagem L-929, e indagou que essa observação possa ter ocorrido devido ao fato de que este era o único adesivo que apresentava em sua composição ácido maleico e metoxi etileno. A citotoxicidade do ácido maleico, para ser utilizado como irrigante de canal radicular, foi observado por Ballal et al.<sup>4</sup> em fibroblastos de hamster (linhagem V79), por meios dos ensaios MTT, Pratt Willis e Clonogênico, sendo que este efeito foi dependente da concentração de ácido maleico utilizada. A

carboximetilcelulose, componente comumente encontrado em adesivos para prótese, é considerada fisiologicamente inerte<sup>83</sup>. Alguns autores<sup>11,17,87</sup> advertem que a identificação de certos componentes responsáveis pela citotoxicidade desses produtos são difíceis de serem efetuadas, tendo em vista que a composição e a concentração desses componentes são raramente disponíveis detalhadamente pelos fabricantes.

As células epiteliais bucais são as primeiras células a entrar em contato com os adesivos para prótese ou com substâncias liberadas durante sua solubilização. Por este motivo, os queratinócitos são células adequadas para avaliar a citotoxicidade desses produtos<sup>11</sup>. Os queratinócitos possuem um papel central na indução da inflamação frente a estímulos nocivos, pois são responsáveis pela síntese de citocinas e mediadores inflamatórios em resposta a um estímulo e também em resposta a outros mediadores inflamatórios<sup>36</sup>. Uma grande quantidade de citocinas é produzida por queratinócitos, entre elas as interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>36</sup>.

Considerando que a maioria dos adesivos testados em estudos de biocompatibilidade eram citotóxicos<sup>3,11,17,20,23,87</sup> e que a literatura é relativamente escassa quanto à utilização de células epiteliais da mucosa bucal, especificamente queratinócitos<sup>11</sup>, nos estudos de citotoxicidade relacionados aos adesivos para prótese, é de interesse investigar o comportamento biológico desses produtos sobre esse tipo celular. Além disso, ensaios que analisem outras funções celulares podem colaborar com informações importantes sobre esses materiais. Os autores não encontraram na literatura estudos sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias por queratinócitos após entrarem em contato com adesivos para prótese. A quantificação da liberação de citocinas locais são necessários para se adquirir conhecimento dos processos imunológicos e patológicos envolvidos nas reações inflamatórias. Outro fator de interesse é a investigação de possíveis componentes desses produtos que podem estar diretamente relacionados ao efeito citotóxico dos adesivos, como a liberação de formaldeído que foi demonstrada por alguns autores<sup>23,24</sup>.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Stafford e Russel<sup>77</sup>, em 1971, avaliaram a possível influência de diferentes adesivos na microbiota bucal (in vitro) e a eficiência de adesivos relacionada à pressão transmitida para a mucosa durante a mastigação de um alimento teste (cenoura) em um usuário de próteses totais (in vivo). Para a verificação da possível influência dos adesivos na microbiota bucal, os autores selecionaram quatro adesivos tipo pó e dois tipo pasta. Foi investigado se os adesivos testados suportavam o crescimento de *Neisseria pharyngis*, *Streptococcus mitis* e *Candida albicans*. Para verificação da eficiência dos adesivos, foi mensurada a pressão transmitida para a mucosa por meio de um transdutor de pressão posicionado na prótese superior de um paciente em duas situações: com a prótese antiga sem retenção e mal adaptada, e após a confecção de novas próteses bem adaptadas, sendo esta avaliação realizada com e sem adesivo. Dois adesivos diferentes foram escolhidos nesta avaliação, sendo um adesivo tipo pó (Corega Denture Adhesive Power) e um tipo creme (Polygrip), que foram aplicados de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados do estudo demonstraram que todos os adesivos testados suportaram o crescimento de *S. mitis* e *C. albicans*, mas não de *N. pharyngis*, sendo que o crescimento de *C. albicans* mostrou a presença de hifas. Os autores ainda concluíram que o uso de adesivos tanto em próteses mal adaptadas quanto em próteses novas bem adaptadas permitem que os pacientes aumentassem a força de mastigação. Além disso, foi verificado que, nas situações estudadas, o tempo de mastigação foi semelhante.

Em 1985, Chew et al.<sup>12</sup> investigaram a eficácia de três marcas comerciais de adesivos (Fixodent creme, o Secure pó e o Super Polygrip creme) quanto à retenção e estabilidade de próteses totais maxilares utilizando um cinesiógrafo. Foram selecionados 10 pacientes usuários de próteses totais maxilares mal adaptadas e foram confeccionadas novas próteses para cada um deles, sendo estas bem adaptadas. A retenção e a estabilidade das próteses totais maxilares foram mensuradas através dos registros cinesiográficos do deslocamento destas próteses, por meio de magnetos adaptados nas faces vestibulares direita e esquerda das próteses maxilares. Foi solicitado que os pacientes mastigassem discos confeccionados de um material reembasador resiliente, por 20 segundos do lado direito e depois pelo mesmo período de tempo do lado esquerdo. Inicialmente, foram obtidos registros sem o uso de nenhum adesivo, sendo assim estabelecido um controle. No primeiro dia de teste, os registros obtidos foram das próteses mal adaptadas e no segundo dia, os registros foram obtidos a partir das próteses bem adaptadas. Para os testes, cada adesivo foi aplicado, e

após 1 hora foram feitas as medidas iniciais, e também foram obtidas medidas três e cinco horas após a colocação do adesivo. Embora em geral os resultados terem indicado que os adesivos avaliados nesse estudo melhoraram a retenção e a estabilidade em ambos os tipos de próteses, seus efeitos foram significantes apenas para as próteses mal adaptadas. Além disso, somente o adesivo Secure promoveu melhora significativa na retenção e estabilidade das próteses bem adaptadas, sendo que este adesivo também foi eleito o melhor pelos pacientes, apesar de ter sido relatada dificuldade de remoção deste produto.

Berg<sup>6</sup>, em 1991, realizou um estudo subjetivo para comparar a influência de 4 adesivos para prótese (Fittydent, Super Poligrip, Super Wernet, Tragacanth) em 32 pacientes desdentados totais bimaxilares em relação a alguns aspectos do uso das próteses. Os participantes foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos, utilizando uma sequência do tipo cross-over chamada Quadrados Latinos 4X4, de forma que todos os participantes utilizaram os quatro adesivos do estudo em períodos distintos por grupo. Cada adesivo foi utilizado por um dia, e no dia seguinte da utilização os participantes foram entrevistados sobre dez diferentes aspectos relacionados à utilização das próteses totais. O autor pôde observar que apenas o adesivo Fittydent aumentou significativamente o grau de satisfação dos pacientes em relação à retenção de ambas as próteses maxilar e mandibular quando comparados ao baseline, sendo este o adesivo preferido por 60% dos entrevistados. Essa observação pode estar relacionada ao fato de que mais da metade dos pacientes sentiram que as outras três marcas comerciais tiveram um tempo de ação reduzido, menor que três horas, em oposição ao adesivo Fittydent, em que mais de 80% dos participantes relataram maior tempo de efeito adesivo. Outra observação constada pelo autor, é que entre 40% a 80% dos pacientes sentiram, dependendo do produto utilizado, que os adesivos não influenciaram a habilidade mastigatória.

O objetivo do estudo de Ekskrand et al.<sup>23</sup>, em 1993, foi avaliar os efeitos citotóxicos, a contaminação microbiana e o conteúdo de formaldeído em 19 marcas comerciais de adesivos para prótese. A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do ensaio ágar overlay em fibroblastos de camundongos. Para detecção da contaminação microbiana as amostras (0,5 mg) foram semeadas sobre placas contendo Sabouraud dextrose ágar (SDA) e Tryptone soya broth (TSB) e incubadas por 48 horas em uma câmara anaeróbica a 37°C. Para a detecção do conteúdo de formaldeído, foram obtidas soluções padrão nas concentrações 2,5µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL. O conteúdo de formaldeído nas amostras foi identificado por alterações de cor nas soluções obtidas, comparativamente às soluções padrão, sendo que a cor amarela indica a presença de formaldeído. Todos os adesivos testados induziram efeitos tóxicos. De

todos os adesivos testados, quatro estavam contaminados e oito apresentaram vestígios de crescimento bacteriano. Quatro amostras apresentaram mudanças de cor semelhantes a soluções padrão de 5µg/ml, duas amostras reagiram com mudanças de cor semelhante à solução padrão de 2,5µg/ml, e as outras duas amostras apresentaram mudanças de cor discretas ou ausentes. Todos os adesivos para prótese avaliados foram citotóxicos e alguns tinham contaminação microbiana, sendo a contaminação mais pronunciada em adesivos à base de matérias-primas “naturais”.

Grasso et al.<sup>35</sup>, em 1994, por meio de um cinesiógrafo, avaliou o efeito de um adesivo para prótese (Fixodent Cream) na retenção e estabilidade de próteses totais maxilares antigas e novas durante a mastigação, deglutição e fala de 20 pacientes (12 homens, com média de idade de 71 anos), em intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6 e 8 horas após colocação do adesivo. Os autores observaram que o uso do adesivo melhorou significativamente a retenção e a estabilidade durante as atividades de mastigação, deglutição e fonética após um período de oito horas, tanto nas próteses novas bem adaptadas, quanto nas antigas mal adaptadas. O uso do adesivo também reduziu o deslizamento das próteses no plano horizontal e vertical, sendo que o deslizamento no sentido vertical foi mais diminuído que o horizontal. Com esse estudo, o autor constatou que o uso do adesivo em uma prótese mal adaptada pode melhorar a sua retenção e estabilidade, fornecendo a estas próteses características semelhantes a uma prótese nova bem adaptada.

Em 1996, Grasso<sup>33</sup> realizou uma revisão de literatura sobre os adesivos para prótese e mudanças de atitudes em relação a estes produtos. De acordo com o autor, os dentistas têm sido relutantes em reconhecer os benefícios de utilização dos adesivos. O autor sustenta que, se usados corretamente, os adesivos podem auxiliar a prática clínica do cirurgião-dentista. De acordo com o autor, apesar das propriedades benéficas dos adesivos, como a melhora da função, retenção e estabilidade, aumento da força de mordida incisal, maior sensação de conforto físico e psicológico ao paciente, muitos profissionais ainda encontram-se relutantes em indicá-los. O autor comenta que profissionais de Odontologia e educadores devem fazer uma avaliação realista do uso adequado dos adesivos e aconselhar os pacientes sobre o uso desses produtos.

Kelsey et al.<sup>43</sup>, em 1997, avaliaram as respostas de 25 usuários de prótese total bimaxilares (13 homens, com idade média de 65 anos) em relação à eficácia de cinco adesivos para prótese (Effergrip, Fixodent, Orafix, Secure, Super Poli-grip). Os pacientes responderam a perguntas sobre o efeito dos adesivos em relação à qualidade e duração da retenção, bem

como sobre a mastigação e atividades funcionais com as próteses, através da aplicação de um questionário de qualidade de vida (health-related-quality-of-life-HRQL). Os indivíduos foram também questionados sobre qual o produto eles consideravam ser o melhor. Foi observado que todos os adesivos proporcionaram um aumento na retenção das próteses maxilares e mandibulares, maior satisfação dos pacientes, conforto, confiança em suas próteses, tempo de ação médio maior que doze horas e, por fim, influência nas atividades funcionais, onde 64% dos participantes relataram uma melhora significativa em suas habilidades mastigatórias. O adesivo indicado como sendo o melhor pelos pacientes foi o Secure, adesivo efetivo não só por aumentar a retenção das próteses, mas também, por aumentar a confiança e satisfação de seus usuários.

Em 1997, DeVengencie et al.<sup>20</sup>, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o pH, a citotoxicidade e a resistência de união adesiva de três adesivos para prótese disponíveis comercialmente, sendo dois do tipo creme (Fixodent Fresh e SuperPoligrip) e um do tipo pó (SuperWernet's), em comparação a um produto denominado Acemannam, composto por carboidratos complexos derivados da *Aloe vera*, e que apresenta características adequadas para ser utilizado como um adesivo. Para avaliação do pH, amostras de cada adesivo (n=5) foram pesadas e solubilizadas em água deionizada na concentração de 5% (1g de adesivo, para 20 mL). A partir dessa solução, foram realizadas diluições seriadas nas seguintes concentrações: 3,3%, 2,5%, 2%, 1,3% e 1%, mantidas em temperatura de 25°C. Imediatamente após a obtenção das diluições, foram obtidos os valores de pH iniciais de cada diluição e também do controle (água deionizada) por meio de um pHmetro. Após as mensurações iniciais, as amostras foram novamente mensuradas em intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 horas. Para avaliação da citotoxicidade, foram utilizados fibroblastos de gengiva humana. Uma solução de 2 ml contendo 25.000 células foi adicionada a cada poço de uma placa de 12 poços e incubada por 24 horas. Após esse período, 2 ml de uma solução de cada adesivo, na concentração de 1%, foi adicionado a cada poço e incubados por 3, 6, 12 e 24 horas a 37°C. E então, foi realizado o teste MTT para verificação da viabilidade celular. Para avaliação da resistência de união dos adesivos, foram simuladas as condições seca e úmida. Para isso, 0,1 g de cada adesivo e de 0,1 g do Acemannam a 5% foram aplicados sobre cilindros de resina acrílica. Em seguida, uma carga de 2 kg foi aplicada no topo do cilindro por 15 segundos e removido. Após 30 segundos, os conjuntos foram separados e a força necessária para separar os cilindros de resina foi mensurada por meio da máquina de ensaios Instron. Foi adicionada água deionizada a 37°C até cobrir dois terços do corpo de prova, e imediatamente foi realizada a mensuração da força de separação, que foi também realizada

após 3, 6, 9, 15 ou 20 minutos. Os autores observaram que os adesivos SuperPoligrip e SuperWernet's permaneceram acima do pH crítico (pH 6,5) em todas as condições testadas no estudo, enquanto o Acemannam e o Fixodent Fresh apresentaram pH abaixo do crítico apenas na diluição de 5%. O adesivo Fixodent Fresh exibiu significativa citotoxicidade em comparação ao Acemannam para fibroblastos humanos após 6 horas de incubação; após 12 e 24 horas de incubação o Fixodent Fresh apresentou citotoxicidade mais elevada do que todos os outros produtos testados. Em geral, o adesivo Acemannam apresentou significativamente a maior resistência de união em ambas as condições testadas: seca e úmida. A resistência de união foi semelhante para todos os produtos nas condições úmidas após 20 minutos, entretanto, nas condições úmidas de 9 e 15 minutos, o adesivo Fixodent Fresh apresentou resistência de união significativamente menor em comparação com os outros produtos. Os autores concluem que em geral, devido às condições favoráveis obtidas em comparação aos três adesivos comerciais testados neste estudo, o produto Acemannam pode ser um adesivo eficaz.

Por meio de uma avaliação subjetiva, Uysal<sup>82</sup> (1998) realizou um estudo para comparar quatro marcas comerciais de adesivo tipo fita (Fittydent I, Fittydent II, Profetix, Seabond). Participaram do estudo 32 usuários de próteses totais mandibulares, que tiveram suas próteses classificadas de acordo com o índice de Kapur. Os 32 participantes foram randomizados e distribuídos em quatro grupos distintos, de forma que todos os grupos utilizaram o adesivo em períodos diferentes (Quadrado latino 4X4). Cada adesivo foi utilizado por 24 horas e após esse período foi aplicado um questionário de satisfação com perguntas relacionadas à retenção, tempo de ação, efeito na função, dificuldade de remoção, e avaliação global do adesivo. Foi observado pelos autores que os adesivos Fittydent I e II foram significativamente melhores que os outros adesivos quanto ao tempo de ação, efeito na mastigação, dificuldade de remoção e avaliação geral. Por outro lado, o Profetix e o Seabond, após três horas de uso, apresentaram-se em quantidade insuficiente na prótese, em oposição aos outros dois produtos que, mesmo após 10 horas de utilização, estavam com viscosidade adequada. Ainda, os adesivos Fittydent I e II aumentaram a habilidade mastigatória de pacientes que utilizavam próteses mandibulares com pobre ou regular retenção (n=22). Foi relatado pelos usuários de próteses com boa retenção, sensação desagradável de compressão e diferenças nos contatos oclusais (n=10), sendo que seis desses pacientes relataram que não usariam adesivos tipo fita, enquanto que quatro pacientes relataram sentir sintomas como queimação, compressão e eritema na mucosa mandibular. Dessa forma, os autores concluem o

estudo informando que os adesivos tipo fita, especialmente o Fittydent, comportam-se como um material reembasador em próteses com regular ou pobre retenção.

Tendo em vista que poucos relatos na literatura odontológica apontam o número de usuários de próteses totais que utilizam regularmente adesivos para prótese, Coates<sup>14</sup>, em 2000, avaliou a incidência do uso de adesivos em usuários de próteses totais, para determinar o grau de sucesso de seu uso e as razões para seu uso atual ou não. Para este estudo, 146 pacientes foram entrevistados por meio da aplicação de um questionário. O grupo pesquisado foi dividido em três categorias, aqueles que nunca haviam utilizado adesivos, os que já utilizaram, mas não utilizam mais, e aqueles que utilizam regularmente o produto, sendo realizadas questões pertinentes a cada categoria. Neste levantamento, 35,6% eram do gênero masculino, e 65,7% dos pacientes tinham mais de 60 anos. 54,9% dos pacientes utilizavam próteses totais há mais de 10 anos e 17,8% por 20 anos ou mais. 67,1% dos pacientes relataram nunca ter utilizado algum tipo de adesivo, 32,9% já haviam utilizado, porém apenas 6,9% continuavam utilizando. Foi observado que poucos pacientes consideravam os adesivos produtos caros, no entanto, um grande número de pacientes sentiu dificuldade em utilizá-lo, relataram sabor e textura desagradável, difícil aplicação, ânsia e náuseas, e difícil remoção dos tecidos bucais e da superfície da prótese total. Os pacientes que atualmente utilizavam adesivos estavam satisfeitos com estes produtos. Assim, foi observado neste estudo que 52% dos pacientes não sentiram necessidade de utilizar adesivos para prótese pois consideravam suas próteses satisfatórias, 20,5% não sabiam da existência dos adesivos e 32,9% dos pacientes tinham utilizado adesivos pelo menos um vez, mas apenas 6,9% utilizam esses produtos regularmente.

Adesivos para prótese são amplamente utilizados por idosos, e por não se saber se esses produtos permitem ou não o crescimento microbiano, Makihira et al.<sup>51</sup>, em 2001, investigaram o efeito de seis adesivos sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis*. O grupo controle do estudo foram espécimes de resina acrílica obtidos nas dimensões 10 mm x 10 mm x 0,7 mm (Bio Resina, Shofu). As amostras de adesivo e os corpos-de-prova em resina acrílica foram colocados no fundo da placa de cultura para células. Foram inoculados 50 µL da suspensão com a levedura em cada amostra e incubados a 37°C por uma hora para promover a adesão das leveduras na superfície dos espécimes. Após uma hora de incubação, 2,0 mL de caldo Sabouraud modificado foi cuidadosamente dispensado em cada poço e incubados a 37°C por 120 horas. As mudanças de pH neste meio de crescimento foram monitorados em intervalos de 6 a 12 horas. Os autores observaram que quatro adesivos reduziram o pH do meio, o que não foi visto para outros dois adesivos e na resina acrílica

(grupo controle). Os autores concluíram que os adesivos para prótese testados possuíam atividade antifúngica em maiores ou menores graus. No entanto, um dos produtos testados reduziu o pH do meio para menos de 5,0. Assim, atenção deve ser dada para o tipo de adesivo utilizado, principalmente considerando o uso regular destes produtos.

Kim et al.<sup>44</sup>, 2003, avaliaram o efeito de um adesivo para prótese (Poly Grip Free) tipo creme sobre a microbiota de espécies de *Candida* na prótese e na saliva de indivíduos que utilizaram o adesivo por um período de 14 dias. Foram selecionados 12 usuários de próteses totais superiores, apresentando retenção e estabilidade adequada, sem sinais de inflamação tecidual e que eram positivos para presença de espécies de *Candida*. Todos os participantes foram orientados a higienizar a prótese diariamente somente com água e escova para prótese total. Os pacientes foram orientados a não utilizar nenhum tipo de adesivo nos primeiros quatorze dias, e após esse período utilizar o agente adesivo indicado. As coletas da saliva e do material microbiológico das próteses foram realizadas nos dias 0, 14 e 28. Os resultados do estudo demonstraram que não houve diferença significativa na quantidade de microrganismos na cavidade bucal e nas próteses em relação à utilização ou não do agente adesivo no período avaliado. Dessa forma, os autores concluíram que o adesivo testado não alterou significativamente a microbiota bucal durante o período experimental de 14 dias, e que a higiene das próteses realizadas pelos pacientes pode ter sido um fator determinante neste resultado.

Tendo em vista que adesivos para próteses são produtos que não necessitam de prescrição para serem utilizados, Grasso<sup>34</sup>, em 2004, realizou uma ampla revisão de literatura sobre o controverso tema “adesivos para prótese”, dispondo-se a apresentar uma visão geral sobre este tema. Adesivos para prótese foram utilizados pela primeira vez no final do século XVIII, a primeira patente foi concedida em 1913 e foram mencionados na literatura odontológica em 1935 pela American Dental Association. Em 1939, já havia cerca de 15 milhões usuários de prótese total utilizando esses produtos, o que representou uma renda anual de 2,5 milhões de dólares, e em 1994 esse valor foi próximo de 200 milhões de dólares. Os adesivos para prótese podem ser divididos em dois grupos: solúveis e insolúveis. O grupo insolúvel inclui o adesivo tipo fita, e o grupo solúvel inclui cremes e pós. Os adesivos do grupo solúvel apresentam ingredientes que são misturas de sais de polímeros que apresentam diferentes graus de solubilidade em água, com ações a curto e longo prazo. A eficácia dos adesivos para prótese foi melhorada com a adição de sais de cálcio à mistura. Em 1980, a formulação dos adesivos foi novamente melhorada pela adição de zinco. Os componentes inativos são: vaselina, óleo mineral, e o óxido de polietileno; óleos de hortelã, pimenta e

mentol para dar sabor; corantes; borato de sódio, álcool metílico, ou poli-paraban como conservantes. É conveniente e necessário tornar-se parte integrante do tratamento protético a instrução sobre o uso, custo, indicações, contraindicações e opções de seleção dos adesivos. Para o autor, os profissionais da área e professores de Odontologia têm sido resistentes em aceitar o uso de adesivos, apesar do fato de que estes materiais são utilizados por milhões de usuários de prótese total. Foi demonstrado cientificamente que o uso de adesivos para prótese pode melhorar a função, retenção, estabilidade e força de mordida em próteses bem adaptadas. Alguns riscos podem ser observados quanto à utilização de adesivos, como a presença de lesões na mucosa que suporta a prótese. Um exemplo é a presença de neoplasias e hiperplasias que acabam levando a uma desadaptação da prótese e são mascaradas pela utilização do adesivo até que tenham alcançado uma dimensão significativa.

Uma vez que a utilização de adesivos para próteses visa subjetivamente beneficiar os usuários de prótese total proporcionando um melhor ajuste e conforto de suas próteses e melhorar a sua capacidade de mastigação e confiança, o objetivo do estudo de Ozcan et al.<sup>61</sup>, em 2004, foi investigar, através de um questionário, a abordagem e o pensamento de usuários de próteses totais quanto aos adesivos e verificar a utilização desse adesivo e as razões para o uso atual ou não utilização desse produto. Nesse estudo realizado em Istambul, Turquia, 115 usuários de próteses totais foram entrevistados sobre seus conhecimentos e experiência sobre adesivos para prótese, através de um questionário. Nesse levantamento, 62 pacientes eram mulheres (54%), a média de idade dos pacientes foi de 64 anos. Cento e seis (92%) pacientes nunca haviam utilizado adesivos para prótese. A maioria dos pacientes (73%) que não utilizavam adesivos estava satisfeita com suas próteses, porém, um número significativo desses pacientes, 101 (87%), não sabia da existência desses produtos. Nove (8%) pacientes relataram ter tentado usar algum tipo de adesivo, e nenhum dos pacientes estavam utilizando algum tipo de agente adesivo. Aqueles que abandonaram o uso de adesivos se queixaram principalmente que estes produtos não melhoraram a capacidade de mastigação e adaptação da prótese de forma significativa. Segundo os autores, o resultado desse estudo demonstrou que o conhecimento sobre adesivos entre usuários de próteses em Istambul não é satisfatório, e, além disso, a indicação desses produtos é geralmente considerada um sinal de fracasso do dentista.

A avaliação clínica do uso de um adesivo (Fixodent creme) foi realizada por Psillakis et al.<sup>66</sup>, em 2004, para avaliação do grau de retenção da prótese total superior e o grau de satisfação, quando os pacientes faziam uso deste agente adesivo. Participaram deste estudo 194 pacientes usuários de prótese total superior. Foram obtidos dados da força de mordida máxima e do

deslocamento da força transmitida para a prótese total superior dos pacientes antes e após a utilização do adesivo, avaliada através do uso de um gnatomanômetro. Também foi avaliado o desempenho da prótese em relação à fala e mastigação, ajuste, conforto e confiança quando faziam ou não o uso do adesivo, através de um questionário. Em relação à força de mordida, houve uma melhora de 63,4% com o uso do adesivo. Respectivamente, um melhor desempenho da prótese (em relação ao deslocamento da força de mordida), fala e mastigação, ajuste e conforto, e confiança foi verificado por 79,2%, 55,7%, 56,2% e 63,9% dos pacientes. Dessa forma, os autores concluíram que o uso do adesivo foi positivo para os aspectos avaliados.

Visto que um adesivo para prótese ideal deve apresentar um valor de pH neutro ou ligeiramente básico, retenção satisfatória, e um mínimo de toxicidade para a mucosa oral, o objetivo do estudo de Zhao et al.<sup>87</sup>, em 2004, foi avaliar as propriedades (pH, força de união e citotoxicidade) de um novo adesivo para prótese do tipo creme (Comfort-DA, desenvolvido pelos autores). Para verificação do pH, uma amostra do material foi mensurada e misturada em água deionizada (1g/10ml – solução a 10%), e, então, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se as seguintes concentrações: 1, 2, 3, 5 e 10%. Imediatamente após a preparação das amostras, foram obtidos valores de pH para cada diluição e da água deionizada, utilizada como controle. Após as leituras iniciais do pH, as amostras e o controle foram medidos em intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas, em triplicata. Para avaliação da força de união, cilindros de resina acrílica foram utilizados. Um adesivo disponível comercialmente (Fittydent) foi utilizado como controle. O teste foi realizado através da aplicação de 0,3 g de adesivo sobre a superfície seca e altamente polida de cilindros de resina acrílica. Em seguida, uma carga de 2 kg, foi aplicada no topo do cilindro de resina acrílica por 15 segundos para assegurar uma força de aplicação consistente. O peso foi então removido por 30 segundos. Finalmente, os conjuntos foram separados. A força necessária para separar os cilindros de resina foi mensurada e registrada. Cada adesivo foi testado por sete vezes. Os testes foram realizados em duas condições experimentais: com uma velocidade de 1 mm/min; e com um aumento de força de tração de 20 g/s. Para o ensaio de citotoxicidade, inicialmente foi preparada uma solução de 4g do adesivo Confort DA com 20ml do meio de cultura DMEM, a qual foi incubada por 3 dias. Foi utilizado o teste de viabilidade celular MTT em fibroblastos humanos, após 2, 3 e 4 dias de incubação das células com os extratos do produto previamente preparados nas concentrações de 50 e 75%. Os autores puderam observar que o novo adesivo apresentou alterações mínimas de pH ao longo do tempo, permanecendo próximos do neutro a levemente alcalino. Também foi observado que o novo adesivo apresentou uma força de

união significativamente maior que o adesivo Fittydent utilizado como controle. Em relação à citotoxicidade, o novo adesivo apresentou ligeira toxicidade. Assim, ficou evidente para os autores que o desempenho favorável dessa nova formulação de adesivo (Comfort) indica a eficácia do produto.

O objetivo do estudo *in vitro* de Al et al.<sup>3</sup>, em 2005, foi analisar a biocompatibilidade de adesivos para prótese, uma vez que esses produtos absorvem água, tornam-se viscosos e, devido a este processo, constituintes como corantes, aromatizantes, agentes umectantes e conservantes podem ser liberados e induzir reações adversas na mucosa bucal dos usuários desses produtos. Cinco marcas comerciais foram avaliadas, sendo três do tipo creme (Blend-a-dent, Fittydentsuper-adesivo e Protefix creme), um do tipo pó (Protefix pó) e um do tipo fita (Protefix fita). Os adesivos foram testados diretamente ou por meio de extratos. Para o ensaio HET-CAM (Hens Egg Test Chorionallantoic Membrane), os adesivos em teste foram aplicados diretamente ou por meio de extratos nas concentrações de 5 e 10% sobre a membrana corioalantóide de ovos embrionados de nove dias. A membrana foi examinada através de um fotomacrocópio. Para o ensaio difusão em ágar, após a cultura e confluência celular de fibroblastos L929 ser obtida, o meio de cultura foi removido e um novo meio com 1,5% de agarose foi acrescentado sobre as células. Depois da solidificação da agarose, as células foram coradas com um corante vital (vermelho neutro). Discos de teflon com os adesivos tipo creme e tipo pó foram posicionados sobre a superfície da agarose. E o adesivo tipo fita umedecido foi colocado diretamente sobre a agarose. As células foram examinadas em microscopia invertida para mudanças celulares e citólise. Para o ensaio difusão em filtro, as células foram cultivadas sobre filtros de acetato de celulose de 24 a 48 horas. Após a confluência celular, os filtros foram lavados com PBS aquecido, e posicionados com as células para baixo em um suporte de agarose. O adesivo tipo fita foi umedecido e colocado diretamente sobre o filtro. Já os adesivos tipo creme e o pó umedecido foram aplicados esparsamente sobre o filtro. Depois de 2 horas de incubação a 37°C a 95% de CO<sub>2</sub>, as amostras foram removidas dos filtros e os filtros lavados com PBS aquecido. As células foram coradas utilizando um método enzimático empregado para oxidação nitro azul tetrazolium para demonstrar a atividade da enzima succinato desidrogenase, em células viáveis. As zonas que apresentaram coloração reduzida foram medidas com precisão de 0,5 mm utilizando-se uma régua. Para o ensaio MTT, foram obtidos extratos dos adesivos nas concentrações de 1% e 2%, após incubação por 24 horas a 37°C. Depois desses períodos, os extratos foram esterilizados por filtração. As células foram incubadas em contato com os extratos por 24

horas, e em seguida foi realizado o ensaio MTT. Foi possível verificar pelo método HET-CAM que nenhum dos adesivos testados produziu uma irritação significativa na membrana coriônica e, pelo teste de difusão em filtro, que nenhum adesivo foi citotóxico. Através dos testes MTT e difusão em ágar, que utilizam uma exposição mais prolongada, quando comparados aos testes anteriores, foram verificados que um dos adesivos testados apresentou citotoxicidade severa (Blend-a-dent).

O objetivo do estudo de Kulak et al.<sup>46</sup>, em 2005, foi avaliar o desempenho de dois adesivos (Kukident e Corega) por meio de um questionário. Para isso, 30 usuários de próteses totais (16 do sexo masculino), com 62 anos em média, participaram do estudo. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 15 pacientes, e cada grupo foi orientado a utilizar um dos dois tipos de adesivos propostos no estudo seguindo as recomendações do fabricante. Após uma semana do uso dos adesivos, os pacientes preencheram um questionário. Através desse estudo foi possível verificar que para a prótese total superior não houve diferença entre os dois adesivos quanto à retenção da prótese, já em relação à prótese inferior, as respostas ao questionário demonstraram que o adesivo Kukident foi mais eficiente que o Corega. O adesivo Kukident também mostrou superioridade em relação à capacidade de mastigação dos pacientes e duração da retenção após duas horas de uso. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois adesivos em relação às propriedades gustativas e a remoção dos adesivos das próteses. Dessa forma, os autores concluíram que todos os indivíduos responderam que a retenção de suas próteses era um pouco melhor ou muito melhor quando qualquer um dos adesivos foi utilizado.

De Baat et al.<sup>16</sup>, em 2007, avaliaram o efeito de um adesivo para prótese total em relação à retenção de próteses totais maxilares usando gnatomanômetros descartáveis. A máxima retenção das próteses foi determinada através de registros da força máxima incisal, definida como a pressão que o paciente pode aplicar nos dentes anteriores até o deslocamento da prótese. Participaram do estudo 88 pacientes que haviam sido selecionados para receber tratamento com prótese total maxilar e que apresentavam na mandíbula dentes naturais, prótese fixa ou prótese removível. Foi utilizado neste estudo um adesivo do tipo creme (Kukident). Inicialmente, a força máxima incisal foi medida sem adesivo. Em seguida, a prótese foi removida, limpa e seca, e o adesivo foi aplicado. A prótese foi levada à boca do paciente e após 3 minutos a força máxima incisal foi registrada. Esses registros foram realizados nos pacientes utilizando as próteses antigas e cerca de duas semanas após instalação das próteses novas. Diferentes níveis de força incisal foram observados. O efeito do adesivo na força máxima incisal foi significativo nas próteses antigas e nas próteses novas.

Além disso, as próteses novas tiveram uma melhor força máxima incisal em comparação às antigas, com ou sem adesivo.

O objetivo do estudo de Sato et al.<sup>71</sup>, em 2008, foi avaliar de forma objetiva e subjetiva a retenção das próteses totais e a facilidade de remoção de um novo adesivo para prótese do tipo gel e de um adesivo do tipo creme disponível comercialmente através de um estudo cross-over. Participaram do estudo onze usuários de próteses totais, sendo 3 homens e oito mulheres e idade média de 73,7 anos, usuários de próteses totais com comprometimento dos tecidos de suporte maxilar, avaliados através do índice de Kapur. A retenção foi avaliada objetivamente pela medida da força máxima de mordida do primeiro molar e máximo apertamento voluntário registrados unilateralmente na região de primeiro molar do lado de preferência de mordida do paciente, usando um medidor de força oclusal. Para avaliar a facilidade de remoção do adesivo, os autores coraram os adesivos com o corante índigo carmim 0,4%. Antes das avaliações, uma fina e uniforme camada de 0,8g de adesivo foi aplicada na superfície interna das próteses totais superiores. Trinta minutos depois, os pesquisadores removeram as próteses e observaram a mucosa bucal dos pacientes, considerando o adesivo remanescente como baseline. Os métodos de remoção testados foram realizados pelos participantes da pesquisa em estágios, utilizando-se bochechos com água em temperatura ambiente, gaze ou água morna a 70°C. A facilidade de remoção do adesivo da mucosa foi avaliada por meio de scores de 0 a 4 para quantificar a área remanescente de adesivo na mucosa bucal dos pacientes. A retenção da prótese e facilidade de remoção também foram avaliadas subjetivamente através de um questionário. Foi observado que os dois adesivos aumentaram a retenção das próteses, no entanto, o adesivo tipo creme apresentou uma retenção significativamente maior, quando comparado ao tipo gel. Com relação à facilidade de remoção, o adesivo tipo gel foi mais fácil de ser removido quando comparado ao tipo creme, sendo que o gel foi removido apenas com os bochechos. Pela análise subjetiva foi possível observar que ambos os adesivos foram semelhantes em relação à retenção e facilidade de remoção.

O estudo de Spenciere et al.<sup>76</sup> (2009) tinha como objetivo avaliar o impacto do uso de adesivos do tipo fita no grau de satisfação de pacientes institucionalizados e usuários de próteses totais, utilizando um questionário adaptado e baseado nos índices OHIP e OHRQL. Foram selecionados 29 usuários de próteses totais que haviam recebido suas próteses há pelo menos seis meses, sem relato de dor ou desconforto que impedisse seu uso diário. Todos os pacientes foram submetidos a um exame clínico prévio, que atestou o estado de saúde bucal, e um questionário contendo seis questões (ajustadas e baseadas nos índices OHIP e OHRQL)

foi aplicado por um único examinador para avaliar condições epidemiológicas (gênero e idade), grau de satisfação em relação à retenção das próteses e desempenho mastigatório frente a alguns alimentos (arroz, macarrão, cenoura, maçã, queijo, carne, pão e alface). Após exame clínico inicial e aplicação do questionário, os pacientes receberam instruções para o uso da fita adesiva (Corega Fita Adesiva), durante um período de 30 dias. Após esse período, todos os pacientes foram chamados para novo exame e o questionário foi reaplicado para comparação dos resultados antes e após uso do adesivo, em termos de percentagem. Dos 29 pacientes que participaram do estudo, 51,7% eram do gênero feminino, com idade de 63,5 anos em média. O uso da fita adesiva apresentou impacto positivo no grau de satisfação dos pacientes, considerando-se os aspectos de retenção e desempenho mastigatório, com exceção aos alimentos macarrão e alface, que não tiveram suas percentagens alteradas após o uso da fita adesiva. Também foi observado, em termos de percentagem, que as respostas referentes à retenção da prótese inferior foram maiores em comparação à prótese superior após a utilização da fita adesiva, aspecto este provavelmente relacionado com a menor retenção das próteses inferiores antes do uso do adesivo.

Em 2010, Tezvergil-Mutluay et al.<sup>80</sup> realizaram uma revisão da literatura sobre os sérios efeitos adversos sistêmicos da ingestão excessiva e prolongada de zinco, pelo uso indiscriminado de adesivos para prótese. O zinco foi introduzido, em 1988, em uma mistura de copolímeros para estabilizar os adesivos. Recentemente, houve um aumento do número de eventos adversos relatados na literatura indicando que a ingestão em excesso de zinco, particularmente associada com o uso excessivo de adesivos para próteses contendo zinco, poderia induzir à deficiência de cobre. Essa deficiência de cobre pode resultar em supressão da medula óssea e problemas neurológicos como a polineuropatia, que leva a dormência e formigamento das extremidades, perda de equilíbrio, e problemas motores. Três adesivos da GlaxoSmithKline (GSK) continham zinco, o Super Poligrip “Extra Care”, o Super Poligrip “Original” e o Super Poligrip “Ultra Fresh”. Em 2010, a GSK divulgou um comunicado anunciando que a empresa deixaria de fabricar ou vender adesivos contendo zinco, para evitar futuros problemas para os pacientes, e informou que passaria a comercializar os adesivos livre de zinco Poligrip Super “Free”, Super Poligrip “Comfort Seal Strips” e Super Poligrip “Power”. Até a data do estudo, a Procter & Gamble não havia anunciado planos para remover o zinco do Fixodent, que segundo o fabricante tem apenas metade do zinco que o Poligrip da GSK.

Devido a necessidade de estudos clínicos sobre o impacto dos adesivos para prótese na qualidade de vida relacionada à saúde bucal (OHRQoL) de usuários de prótese

total, Nicolas et al.<sup>58</sup>, em 2010, avaliaram se a utilização de um agente adesivo poderia melhorar a OHRQoL (abordagem subjetiva) e parâmetros da mastigação (abordagem objetiva) de usuários de próteses totais novas. Os participantes da pesquisa eram usuários de próteses totais novas, sendo que após um período de 3 meses de adaptação com as novas próteses, esses pacientes foram avaliados em termos de OHRQoL utilizando o questionário GOHAI, e foram incluídos no estudo apenas os pacientes que apresentaram pontuação baixa (<50). Participaram do estudo 14 pacientes, com  $65 \pm 7$  anos em média. Os participantes foram instruídos a utilizar um adesivo (Polident) nas próteses superior e inferior, diariamente, por um período de 6 meses. Os períodos de avaliação foram o início do estudo (T0), onde os pacientes foram instruídos a utilizar o adesivo por três meses, após três meses do início do estudo (T1), onde os pacientes foram convidados a decidir se gostariam de continuar a usar o adesivo por mais três ou parar de utilizá-lo e, seis meses após o início do estudo (T2). A abordagem objetiva para avaliar os parâmetros de mastigação foi realizada por meio de vídeos, utilizando como alimentos teste maçã e queijo. As sequências de vídeo foram analisadas usando o Windows Media Player. Os parâmetros de mastigação avaliados foram: duração da sequência mastigatória, número de ciclos mastigatórios por sequência mastigatória e taxa mastigatória (número de ciclos/ duração). Os resultados deste estudo mostraram uma melhora significativa na qualidade de vida dos participantes e ligeiras modificações em seus parâmetros de mastigação. Antes de usar adesivos, os participantes com novas próteses apresentaram baixos escores GOHAI. Houve uma melhora significativa na qualidade de vida relacionada à saúde bucal nos períodos de 3 e 6 meses, embora alguns participantes tenham parado de usar o adesivo. O uso do adesivo durante os primeiros 3 meses facilitou a integração neuromuscular e psicológica dos usuários de próteses totais. Os parâmetros avaliados relacionados à mastigação não apresentaram melhora significativa com o uso do adesivo, sugerindo que estes participantes já haviam atingido os seus limites de adaptabilidade das próteses. Foi verificado nos participantes que pararam de usar o adesivo após três meses, que os escores GOHAI não evoluíram entre os períodos três e seis meses, sugerindo que os seus limites de adaptabilidade das próteses haviam sido alcançados nos três primeiros meses do início da avaliação, e que eles não sentiram a necessidade de continuar usando o adesivo. Assim, tais pacientes pareceram manter os benefícios da adaptação adquirida através da utilização do adesivo mesmo depois de terem parado de utilizá-lo. Dessa forma, os autores concluíram que 3 meses de uso do adesivo resultou em melhorias em todos os parâmetros explorados por meio do questionário GOHAI. No entanto, não houve diferenças significantes nos parâmetros de mastigação avaliados.

Oliveira et al.<sup>60</sup>, em 2010, avaliaram o efeito da utilização de uma fita adesiva para próteses sobre a colonização de espécies de *Candida* e outras leveduras, durante um período de 14 dias. Participaram do estudo 24 indivíduos saudáveis, completamente desdentados, de ambos os sexos, variando de 45 a 70 anos de idade, que não utilizavam antibióticos sistêmicos, não tinham sinais clínicos de candidose e com teste positivo para espécies de *Candida* na saliva. Todos os indivíduos receberam próteses totais novas e bem adaptadas, com retenção e estabilidade satisfatórias. Os 24 indivíduos foram divididos aleatoriamente em dois grupos (grupo com adesivo e grupo controle – sem adesivo). O grupo com adesivo foi instruído a usar o Ultra Corega fita adesiva na prótese maxilar seguindo as recomendações do fabricante. Amostras de saliva foram coletadas sucessivamente dos pacientes do grupo controle e dos pacientes do grupo com adesivo, após 7 e 14 dias. Após processamento e diluições seriadas a partir do material coletado, 0,1 mL de cada amostra foi semeada em duplicatas em placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar com cloranfenicol e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias que tinham características morfológicas típicas do gênero *Candida* foram contadas (UFC/mL de saliva). Os autores observaram que a utilização da fita adesiva Ultra Corega durante o período de 14 dias não causou alteração a contagem de UFC de *Candida* e outras leveduras na cavidade bucal dos indivíduos do grupo adesivo quando comparados pelo mesmo período com os indivíduos do grupo sem adesivo (controle).

O objetivo do estudo de Zavanelli et al.<sup>86</sup>, 2010, foi avaliar o impacto do uso de adesivos tipo fita na qualidade de vida de pacientes institucionalizados e usuários de próteses totais convencionais. Foram selecionados 29 usuários de próteses totais convencionais bimaxilares. Aplicou-se um questionário (adaptado e baseado nos índices OHIP e OHROL) para avaliar questões epidemiológicas (gênero e idade), qualidade de vida, paladar e anseio por tratamento com implantes. Em seguida, os pacientes receberam orientações para o uso de adesivos (Corega Fita Adesiva), durante um período de 30 dias. Após esse período, o questionário foi reaplicado, acrescentando-se questões relativas ao desempenho do adesivo, para comparação antes e após o uso da fita adesiva em termos de porcentagem. Os resultados evidenciaram um impacto positivo na qualidade de vida dos respondentes após o uso da fita adesiva, evidenciando diminuição de dor e desconforto, principalmente das próteses totais inferiores e redução pelo anseio de tratamento com implantes, passando de 75,8% para 37,9%, depois do uso do adesivo.

Diretrizes baseadas em evidências para o cuidado e manutenção de próteses totais foram publicadas por Felton et al.<sup>27</sup>, em 2011. Em relação aos adesivos para prótese, os

autores comentaram que estes produtos, quando usados corretamente, podem melhorar a retenção e estabilidade das próteses totais e impedir o acúmulo de partículas de alimentos embaixo das próteses, mesmo estas estando bem adaptadas. Além disso, podem melhorar a percepção do usuário de prótese em relação à estabilidade, retenção e qualidade de vida. No entanto, não há evidências suficientes de que possam melhorar a função mastigatória. Os autores comentam que não existem evidências quanto os efeitos dos adesivos em relação aos tecidos bucais quando utilizados por períodos superiores há seis meses. Assim, concluem que o uso prolongado desses agentes não deve ser considerado sem uma avaliação periódica da qualidade da prótese e da saúde dos tecidos de suporte por um dentista. O uso inadequado de adesivos contendo zinco pode levar a efeitos adversos sistêmicos, e como medida de precaução devem ser evitados. Os autores também informaram que os adesivos devem ser usados apenas em quantidades suficientes (três ou quatro porções do tamanho de uma ervilha para cada prótese) e devem ser completamente removidos da prótese e da cavidade bucal diariamente. Na indicação do uso de adesivos, os autores destacam que a avaliação periódica de um cirurgião-dentista é de extrema importância para avaliar a adaptação e estabilidade das próteses, principalmente nos casos em que quantidades crescentes de adesivos tornam-se necessárias para atingir o mesmo nível de retenção da prótese.

O objetivo do estudo de Figueiral et al.<sup>28</sup>, em 2011, foi avaliar o efeito de diferentes adesivos para prótese sobre a retenção de próteses totais superiores por meio de teste de tração utilizando-se um transdutor intraoral. Para isso, 26 usuários de prótese total superior e inferior participaram do estudo. Apenas a retenção das próteses superiores foi avaliada, inicialmente sem agente adesivo e, então com cada um dos cinco diferentes adesivos avaliados (Protefix creme, Corega creme, Corega ultra pó, Protefix pó e Corega fita). No final dos testes, uma avaliação adicional foi realizada sem adesivo. O centro da prótese foi determinado a partir do centro de um triângulo definido por três estruturas anatômicas (tuberosidades maxilares e papila incisiva), onde um rebite foi colocado para receber um parafuso para conexão com o transdutor. Três medições foram obtidas para cada um dos testes realizados, e a média destas medições foi calculada. Uma placa de aquisição de dados e o software LabView (National Instruments) permitiu a leitura dos valores. Todos os adesivos excluindo o Corega do tipo fita produziram uma melhora estatisticamente significativa na retenção das próteses totais superiores, sendo que o Corega creme, Corega pó e Protefix pó mostraram valores de retenção semelhantes. Os autores também verificaram que o transdutor de resistência intraoral utilizado foi eficaz no estudo de retenção a forças verticais. Os autores relataram que a retenção e a estabilidade são difíceis de dissociar em testes clínicos, mas com

um transdutor de resistência intraoral, como o utilizado nesse estudo, foi possível analisar apenas a retenção. Apesar da retenção ter sido medida numa situação não funcional, acredita-se que a melhoria da retenção melhora a estabilidade e ambas melhoram a capacidade funcional dos usuários de próteses totais.

Um estudo clínico realizado por Mañes et al.<sup>52</sup>, em 2011, avaliou se os adesivos Benfix, Fittydent e Supercorega usados para melhorar a retenção das próteses totais são realmente eficazes e capazes de aumentar a adesão da prótese com a mucosa que recobre o rebordo residual de pacientes desdentados. O estudo foi realizado com 30 usuários de próteses totais, independentemente de quanto tempo as próteses tinham sido utilizadas, ou da sua qualidade e desempenho relacionado à retenção. A quantificação da retenção sem o adesivo foi realizada como controle. Os pacientes foram orientados a manter a máxima intercuspidação não-forçada por 5 minutos. Após este tempo, e com a boca aberta e o lábio inferior relaxado, a fim de evitar a perda da vedação periférica, um dispositivo com uma escala de medida em gramas foi posicionado na margem da prótese inferior, na região do frênulo lingual. Uma tração foi então aplicada até a prótese ser separada do rebordo residual, e a força de retenção (em gramas) foi registrada pelo dispositivo. Após o registro da retenção da prótese mandibular, um dos adesivos do estudo foi aplicado. A mesma quantidade de adesivo foi utilizado em todos os testes, sendo o material distribuído em três porções equivalentes nas regiões anterior e lateral, em conformidade com as instruções dos fabricantes. O mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado com os diferentes adesivos, sendo repetido três vezes para cada produto e esperando um minuto em oclusão após cada medição. Após completar o estudo com cada adesivo, as próteses foram cuidadosamente higienizadas, a fim de eliminar qualquer efeito residual possível do material anterior. A ordem de aplicação dos adesivos foi randomizada, e todas as medições foram feitas pelo mesmo investigador. Assim, cada paciente foi submetido a três medições da força de retenção sem adesivo (valores controles), e três medições para cada adesivo avaliado. Os resultados mostraram que todos os adesivos resultaram em melhora significativa da retenção das próteses mandibulares quando comparados aos valores controle. Especificamente, o melhor desempenho correspondeu ao adesivo Fitydent, seguido de Benfix e Supercorega.

O objetivo do estudo de Gomes et al.<sup>17</sup>, em 2011, foi avaliar o potencial de citotoxicidade de adesivos disponíveis comercialmente por meio de testes *in vitro* direto e indireto, sob condições estáticas e dinâmicas, em fibroblastos (L929). Para isso, dez adesivos dos tipos creme (Corega, Protefix, Steradent, Novafix, Polident e Kukident), pó (Aderyn, Corega, Protefix) e fita (Corega) foram selecionados. No ensaio de citotoxicidade direto,

foram preparados géis a partir dos diferentes adesivos nas proporções de 50 mg dos adesivos tipo creme e 25 mg dos adesivos tipo pó e fita para 1 ml de meio de cultura. Estes géis foram colocados no fundo de placas de cultura, as quais foram incubadas por 12 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Os fibroblastos L929 foram semeados sobre a superfície do gel preparado a partir dos diferentes adesivos e cultivados por 12 horas. As culturas foram avaliadas quanto à viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT. No final do período de cultura de 12 horas, o pH do meio de cultura foi verificado utilizando um eletrodo de vidro e um medidor de pH. Todas as amostras apresentaram pH de 7,0, exceto o Profetix pó e o Corega fita em que foi observado um pH de 7,5. Na avaliação da citotoxicidade indireta, os fibroblastos L929 foram cultivados na presença de extratos dos adesivos na concentração de 2% para os tipo creme e 1% para adesivos tipo pó e fita. Esses extratos foram incubados a 37°C numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 12 horas, em condições estáticas e sob agitação contínua moderada. Posteriormente, os extratos foram esterilizados por filtração e diluídos. As formulações dos adesivos tipo creme foram testadas nas concentrações de 2%, 1% e 0,5% dos extratos. Já os adesivos tipo pó e o adesivo tipo fita foram testados nas concentrações de 1%, 0,5% e 0,25%. O pH dos extratos foi verificado por meio de um eletrodo de pH de vidro e um medidor de pH e permaneciam próximos do neutro, com exceção dos extratos do Protefix pó e Corega fita (pH em torno de 7,5). Os fibroblastos L929 foram semeados em placas de cultura de 96 poços e cultivadas durante 24 horas para permitir a fixação das células. O meio de cultura foi removido e os extratos foram adicionados à camada de células aderentes. As culturas expostas aos extratos preparados em condições estáticas, foram cultivadas durante 12 horas. As culturas expostas aos extratos obtidos sob agitação contínua, foram cultivadas durante 6, 12, 24, e 72 horas. As culturas foram avaliadas quanto a viabilidade celular por meio do ensaio MTT. Além disso, as culturas expostas por 12 horas aos extratos preparados sob agitação foram corados com Alexa-Fluor 488 conjugado com faloidina para identificação da actina-F do citoesqueleto, e observados por microscopia confocal. Para o ensaio direto, foi observado que os adesivos Protefix e Corega pó apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle (meio de cultura apenas). Em oposição o adesivo Kukident creme foi altamente citotóxico, sendo que os demais adesivos apresentaram uma baixa citotoxicidade. No ensaio indireto, sob condições estáticas, os adesivos Corega creme e Protefix creme não apresentaram efeito sob o crescimento celular, os adesivos Kukident creme e Aderyn creme apresentaram o maior potencial citotóxico com uma redução de 20-60% do crescimento celular, e os demais adesivos apresentaram citotoxicidade com 20% de redução do crescimento celular. Já para o ensaio indireto sob condições

dinâmicas, em geral, extratos causaram efeitos citotóxicos dependentes do tempo de exposição. Os extratos dos adesivos Corega creme, Steradent creme, Novafix creme e Corega fita apresentaram efeitos deletérios significativos durante as primeiras horas de exposição, sendo que, as células foram capazes de se recuperar quando as concentrações dos extratos eram mais baixas. Além disso, para cada concentração testada, a viabilidade das células e proliferação diminuíram com o tempo de exposição (6 a 72 horas). Este efeito cumulativo deletério foi menos pronunciado nas culturas expostas aos extratos dos adesivos Protefix creme, Novafix creme e Corega pó, ou seja, apenas uma ligeira diminuição na viabilidade das células foi observada ao longo do tempo de cultura. O adesivo Kukident creme apresentou o maior efeito deletério nas três concentrações de extrato testadas e tempos mais longos (maior que 12 horas). Por outro lado, os extratos do adesivo Novafix apresentaram um baixo efeito citotóxico sobre a viabilidade celular nas três concentrações testadas. Em relação a organização da actina-F do citoesqueleto, os fibroblastos expostos somente ao meio de cultura (Grupo Controle), por 12 horas, exibiam células bem espalhadas, com uma morfologia alongada e citoesqueleto de actina-F bem desenvolvido e com núcleo proeminente. Os extratos adesivos preparados em condições dinâmicas causaram efeitos deletérios dose dependentes evidentes. Nas concentrações mais baixas (1% cremes e 0,5 pós e fitas), os extratos dos adesivos Steradent creme, Novafix creme e Protefix pó induziram a pequenas alterações morfológicas. O extrato do adesivo Aderyn pó causou um evidente aumento do volume citoplasmático embora células com material condensado também estavam presentes. Os demais adesivos provocaram condensação do núcleo, diminuição significativa do compartimento citoplasmático associados com a concentração do citoesqueleto de actina e arredondamento das células. A exposição aos níveis mais elevados dos extratos dos adesivos (2% cremes, e 1% pós e fita) provocou uma resposta mais significativa da citotoxicidade. As alterações celulares foram mais pronunciadas e, além disso, a ruptura celular foi observada na presença do extrato dos adesivos Protefix creme, Steradent creme, Polident creme, Protefix pó. A redução do número de células aderentes também foi observada na presença de alguns extratos, especialmente para os adesivos Protefix creme, Polident creme, Kukident creme, Aderyn creme e Corega pó. Dessa forma, os autores puderam concluir que os adesivos apresentaram diferentes graus de citotoxicidade e esses resultados foram dependentes do tipo de ensaio (direto/indireto), da concentração do adesivo e do tempo de exposição.

Koronis et al.<sup>45</sup> (2012) avaliaram três marcas comerciais de adesivos para prótese do tipo fita: Fittydent, Protefix e Seabond. Participaram do estudo trinta pacientes (18 homens e 12 mulheres) usuários de próteses totais bimaxilares com necessidade de confecção de

novas próteses. Após a confecção das próteses e sessões de retorno, cada paciente teve seu índice de Kapur para tecidos de suporte mensurado e em seguida os pacientes foram orientados a utilizarem os adesivos propostos durante dois dias. Os participantes foram divididos em grupos de 10 indivíduos cada, e o estudo teve um delineamento cross-over. Um questionário foi aplicado visando avaliar os adesivos quanto à retenção da prótese inferior, a duração da retenção, capacidade mastigatória, efeito dos alimentos e bebidas sobre o adesivo, facilidade de aplicação, limpeza da prótese, possíveis alterações no paladar, sabor do adesivo e efeitos sobre a autoconfiança. Após as três marcas serem utilizadas pelos participantes, questões comparando as três marcas em termos de retenção e preferência por marca comercial foram aplicadas. Os participantes também foram encorajados a relatar quaisquer problemas específicos enfrentados. Os autores concluíram que o uso de adesivos para prótese do tipo fita melhoraram muito a retenção, a capacidade mastigatória, a autoconfiança em atividades sociais e a satisfação dos participantes, especialmente entre aqueles com pobre suporte (Kapur Index) e aqueles que relataram pouca retenção nas próteses inferiores. O adesivo Fittydent obteve o melhor desempenho em termos de retenção, duração da retenção e de autoconfiança nas atividades sociais quando comparado às outras duas marcas comerciais, embora tenha sido relatado também que ele foi o adesivo mais difícil de remover.

Munoz et al.<sup>56</sup>, em 2012, avaliaram o efeito dos adesivos para prótese Super Poligrip Free creme, Super Poligrip Confort Seal Strips fita e um adesivo não comercializado em creme do mesmo fabricante em relação a retenção, estabilidade e movimentos durante a função de próteses bem confeccionadas e bem adaptadas, sendo o controle negativo a não utilização de nenhum agente adesivo. Completaram o estudo 36 pacientes, com idade média de 70, 65 anos. As próteses totais superiores e inferiores foram classificadas de acordo com o índice de Kapur modificado para avaliação da retenção e estabilidade. A força de mordida foi obtida através de um transdutor medidor de tensão instalado nos incisivos das próteses maxilares. A força máxima exercida antes da prótese ser deslocada foi registrada. As leituras foram feitas 1 hora após a aplicação do adesivo. Para verificar-se o deslocamento da prótese, os pacientes foram orientados a dar uma mordida em uma maçã, mastigar completamente e engolir e, em seguida, foi registrado o número de deslocamentos ocorridos durante os três passos. Essas etapas foram repetidas até toda a maçã ser consumida. Esse teste foi iniciado 2 horas após a aplicação do adesivo. Para verificação da eficiência mastigatória foi realizado um método quantitativo com base no consumo de 32g de amendoim. A massa das partículas de amendoim retirada da superfície externa das próteses quando não foi utilizado nenhum agente adesivo foi comparada à situação em que o adesivo foi utilizado. Os amendoins foram

mastigados 2 horas após a aplicação do adesivo. A avaliação do conforto, confiança, satisfação e percepção da oscilação da prótese foi realizada através de uma classificação realizada por cada paciente quando ele comeu a maçã ou os amendoins. O exame bucal no final do uso do adesivo foi realizado e quaisquer achados anormais no exame final que não tinham sido observados no início do estudo foram registrados como eventos adversos. Todos os produtos avaliados nesse estudo foram utilizados de acordo com as informações do fabricante. Os três adesivos testados nesse estudo demonstraram uma melhora significativa no Índice de Kapur modificado, na força de mordida maxilar e no deslocamento da prótese, indicando aumento da retenção e da estabilidade e diminuição do movimento das próteses em função. Da mesma forma, conforto, confiança e satisfação foram significativamente melhores classificados, e um menor movimento de oscilação das próteses foi detectado pelos pacientes quando os adesivos foram utilizados.

Devido às investigações existentes relacionadas aos adesivos para prótese serem limitadas a um pequeno número de microrganismos da microbiota bucal, Ozkan et al.<sup>62</sup>, em 2012, realizaram um estudo in vivo para avaliar o efeito dos adesivos na microbiota bucal de usuários de próteses totais em diferentes intervalos de tempo. Para isso, foram selecionados trinta pacientes (12 do sexo feminino, idade média de 62 anos) com mucosa bucal saudável. Para cada paciente foi confeccionado um novo par de próteses. No dia da instalação das próteses foi realizada a primeira coleta de material microbiológico (controle). As coletas foram realizadas com auxílio de um swab no palato e na prótese, e amostras de saliva também foram coletadas por meio de seringas estéreis. Logo após as coletas, 15 pacientes foram instruídos a usar o adesivo (Kukident) por dois meses. Os outros pacientes não receberam o adesivo e foram considerados o grupo controle. Novas coletas foram realizadas em todos os pacientes um e dois meses após a primeira coleta. Todas as amostras coletadas foram imediatamente processadas para avaliação microbiológica. As amostras foram agitadas e diluições em série até  $10^{-5}$  foram obtidas em solução salina, que em seguida foram inoculadas em Sabouraud Dextrose ágar e ágar sangue. Todas as placas foram incubadas durante 48h a 37°C. As colônias isoladas foram avaliadas de acordo com sua morfologia e formação de pigmento. Características da coloração Gram e testes de catalase e oxidase foram realizados. As amostras foram examinadas quanto à presença de *C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *a-haemolytic streptococci*, *b-haemolytic streptococci*, *Pneumococcus aureus*, *S. anginosus*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, e hifas. A maioria dos microrganismos avaliados não foi identificada e, portanto, não puderam ser analisados

estatisticamente, exceto para *a-haemolytic streptococci* e *C. albicans*. A quantidade de microrganismos acumulados nas próteses dos indivíduos que utilizaram adesivos não foi significativamente diferente dos pacientes que não utilizaram adesivos (grupo controle). Foi observado que o uso prolongado dos adesivos testados por até 2 meses não resultaram em aumento dos microrganismos coletados da microbiota bucal. Os autores concluíram que o uso adesivos não acarretou quaisquer efeitos adversos ou potencial aumento da microbiota bucal mesmo após 2 meses de utilização destes produtos.

O objetivo do estudo de Pero et al.<sup>64</sup>, em 2012, foi investigar, em uma população brasileira, os aspectos relacionados com o uso ou não de adesivos em usuários de próteses totais. A amostra foi composta por 100 participantes usuários de próteses totais bimaxilares (39 do gênero masculino; média de idade de 66 anos). O grupo pesquisado foi dividido em três categorias, sendo a Categoria 1, aqueles que nunca haviam utilizado o produto, Categoria 2, aqueles que já haviam utilizado o adesivo, mas não o utilizam mais, e Categoria 3, aqueles que atualmente utilizam o produto. Questionários foram preparados e aplicados aos participantes, de acordo com cada uma das categorias. Entre os 100 entrevistados, 80% nunca haviam utilizado agentes adesivos, 16% já tinham utilizado pelo menos uma vez, mas já não usavam mais e 4% usavam regularmente o produto. Dentro dos 80% que nunca usaram adesivos, 77,5% informaram que não tinha necessidade, 11,25% não sabiam da existência do produto e 3,75% relataram não ter dinheiro para comprar o produto. Dos 20% que usaram ou usam regularmente adesivos, 35% informaram que foi indicado por um dentista, 50% utilizavam por conta própria, 10% informaram que foi indicado por um amigo, e 5% informaram outra resposta. Entre os participantes que já utilizaram o produto, mas não utilizam mais (16%), o sabor e a consistência foram as reclamações mais citadas, e a dificuldade de remoção do produto dos tecidos bucais e das próteses também foi mencionada. Desta forma, os autores concluíram que a não utilização do produto pelos participantes estava relacionada à não necessidade do uso, já o uso regular foi justificado pela eficácia do produto.

Sampaio-Maia et al.<sup>70</sup> (2012) tinham por objetivo avaliar o efeito de alguns materiais adesivos para prótese disponíveis comercialmente em relação ao crescimento de *C. albicans* in vitro e também em relação à contaminação microbiana desses produtos. Dessa forma, foram utilizados para esse estudo os adesivos dos tipos: creme (Corega, Kukident, Novafix, Polident, Protefix e Steradent), pó (Aderyn, Corega Ultra, Protefix) e fita adesiva (Corega). A contaminação microbiana foi avaliada pela cultura dos adesivos em um caldo BHI, bem como em um meio seletivo para fungos - Sabouraud Dextrose Ágar com cloranfenicol. Para cada tipo de adesivo foram realizadas triplicatas, sendo as unidades

formadores de colônia contadas após 2, 5 e 7 dias de incubação. Nos casos em que foi observado crescimento microbiano foi realizada coloração Gram. A avaliação do efeito do adesivo em relação ao crescimento de *C. albicans* foi realizada através da cultura desse microrganismo no meio Sabouraud Dextrose Agar com cloranfenicol a 37°C por 48h em condições aeróbias, sendo então, uma colônia isolada e cultivada no meio Sabouraud Dextrose Agar a 37°C por 18 horas. Para obtenção da curva de crescimento uma alíquota de 500µL do inóculo foi adicionado a solução controle de Sabouraud Dextrose Agar e a solução dos adesivos a 1% dissolvidos com o meio Sabouraud Dextrose Agar. As amostras foram coletadas após a inoculação (tempo 0) e após 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas, sendo que foram então diluídas em séries de 1:10 em solução salina estéril até a diluição  $10^{-4}$  e semeadas em triplicata em Sabouraud Dextrose Agar com cloranfenicol. Após 48 h de incubação a 37°C, foram contadas as colônias, e os resultados foram expressos em UFC/ml. O pH do meio Sabouraud Dextrose Agar e o pH das solução adesivas a 1% também foram medidos. A maioria dos materiais adesivos estudados induziu alterações morfológicas macroscópicas e microscópicas em leveduras e colônias. Dois adesivos apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento da *C. albicans*, o Kukident creme mostrou um efeito inibitório acentuado (95%), enquanto que o Corega creme mostrou um efeito menos pronunciado (37%). As mudanças de pH encontradas em alguns adesivos pareceram ter pouco efeito sobre o crescimento de *C. albicans*. Considerando esses aspectos, os autores sugeriram que a atividade antifúngica do Kukident creme e Corega creme podem impedir o crescimento excessivo de *Candida* e, por isso, o uso destes adesivos poderia ser benéfico para usuários de prótese total com episódios frequentes de estomatite protética. No entanto, o perfil de citotoxicidade destes adesivos deve ser levado em consideração. Foi ainda ressaltado pelos autores que uma limitação importante deste estudo está relacionada às observações in vitro, em que não são considerados fatores como presença de saliva e fluxo salivar, bem como o pH intraoral.

Por meio de um estudo in vivo, Sumita et al.<sup>78</sup>, em 2012, avaliaram a utilidade do adesivo para prótese New Poligrip em pacientes edentados após maxilectomia em função da quantidade de maxila residual remanescente. Os autores selecionaram oito pacientes desdentados submetidos à maxilectomia e os dividiram em três grupos: Grupo 1 (pacientes com mais da metade de maxila residual) Grupo 2 (maxila residual maior que um quarto e menor que a metade) e Grupo 3 (maxila remanescente residual menor que um quarto). Próteses totais foram confeccionadas e ajustes posteriores durante seis meses foram realizados para adaptação do paciente à sua prótese. Logo após este período de adaptação, a fala dos pacientes e a função mastigatória foram investigadas, através de um teste de inteligibilidade

da fala e de um teste de capacidade de mastigatória. Os pacientes neste estudo nunca haviam utilizado adesivo para prótese. Em 1 dia, foi avaliada a capacidade funcional dos pacientes com duas condições: com e sem adesivo. O desempenho da fala foi avaliado através de um teste de inteligibilidade. Cada indivíduo foi convidado a proferir monossílabos tão claramente quanto possível, com uma pausa entre cada emissão. Cada expressão registrada transmitida para cinco ouvintes inexperientes, que nunca tinham ouvido as declarações dos sujeitos, usando um gravador em um nível médio de pressão sonora de 70 db. Os ouvintes foram convidados a escrever as sílabas que ouviram. Pontuações foram determinadas de acordo com a porcentagem média de respostas corretas. Para o teste de função mastigatória cada paciente foi instruído a mastigar 10 vezes no seu lado habitual um bloco de parafina nas cores verde e vermelho, logo depois o bloco foi removido. Imagens de cada lado do cubo mastigado foram capturadas com uma câmara CCD (XC-003; Sony Co.). Cinco parâmetros sobre o grau de mistura da cor e as formas dos blocos mastigados foram medidos com um analisador de imagem (Luzex-FS; Nireco Co., Tóquio, Japão). Os resultados evidenciaram que o uso do adesivo melhora a fala e a função mastigatória em pacientes desdentados submetidos à maxilectomia. No entanto, deve se considerar que esta eficácia depende da área da maxila residual, especialmente para a função mastigatória. Concluiu-se que o adesivo não tem eficácia na função mastigatória se a maxila remanescente for inferior a um quarto. Por outro lado, o adesivo melhorou a inteligibilidade das palavras para todos os pacientes.

Bartlett et al.<sup>5</sup>, em 2013, investigou como conselhos nutricionais e adesivos para prótese podem estar associados com a ingestão de alimentos mais saudáveis. Trinta e cinco pacientes usuários de próteses totais há mais de um ano (13 do sexo masculino e 22 do sexo feminino, com média de idade de 73,9 anos) foram analisados clinicamente e submetidos a um questionário computadorizado sobre o histórico alimentar. O programa utilizado calculou com base no histórico alimentar os níveis de gorduras totais, gorduras saturadas, ingestão de proteínas e estimativa da ingestão de vitamina C e do número de porções de frutas e legumes. Além disso, cada paciente foi submetido a uma série de perguntas do questionário NDNS (National Diet and Nutritional Survey) que registrou a capacidade de ingestão de uma variedade de alimentos e ao questionário OHIP EDENT. Os pacientes foram orientados a utilizar um adesivo para prótese tipo creme (Poligrip<sup>®</sup>) por 30 dias. Após esse período, os pacientes retornaram e os questionários foram reaplicados. Foi observado aumento da ingestão média de 2,2 porções de frutas/legumes por dia para 3,6. A ingestão de gorduras e gorduras saturadas foi reduzida de 23,2 g para 11,3 g. A ingestão de vitamina C aumentou em 34,4 mg. Todos esses resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,0001$ ). Verificou-se

melhora estatisticamente significativa após utilização de adesivo nas habilidades dos pacientes, mensuradas por meio da utilização das pontuações do OHIP EDENT para mordida ( $p = 0,017$ ) e mastigação de alimentos ( $p = 0,007$ ). Assim, concluiu-se que adesivos podem melhorar o comportamento alimentar de usuários de próteses totais.

O estudo de Polyzois et al.<sup>65</sup>, em 2013, avaliou a atividade antimicrobiana de três adesivos para prótese comercialmente disponíveis (Corega Ultra, Fixodent Original Pro e Biotene Denture Grip), sendo dois convencionais e um desenvolvido especialmente para pacientes xerostômicos frente aos microrganismos *Streptococcus oralis*, *Prevotella oralis*, *S. mutans* e *Fusobacterium nucleatum*, sendo todas bactérias relacionadas ao mau odor bucal. Foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 33402 e cepas clínicas *S. oralis*, *P. oralis* e *F. nucleatum*, isolados da cultura de sangue de pacientes, e incubadas em contato com os adesivos e meio de cultura a 37°C. Após 48 horas, o número de colônias foi contado e a média de unidades formadoras de colônia por mL (ufc/mL) foi calculada. Os autores observaram que houve redução significativa no número dos microrganismos em todos os adesivos utilizados pelo estudo em relação ao grupo controle. Mais especificamente, os resultados demonstraram que o Corega Ultra e o Biotene Denture Grip foram mais eficazes em comparação ao Fixodent Original Pro dependendo do microrganismo testado, sendo que o *F. nucleatum* e a *P. oralis* foram os mais afetados pelo Ultra Corega e Biotene Denture Grip em comparação ao *S. oralis* e *S. mutans*.

Até o momento do estudo de Chen et al.<sup>11</sup>, em 2014, existiam na literatura poucos trabalhos que investigaram as respostas citotóxicas de diferentes linhagens celulares quando expostas a adesivos para prótese. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi determinar a citotoxicidade de três adesivos para prótese (Polident creme, Protefix creme e Protefix pó) sobre queratinócitos e fibroblastos humanos e fibroblastos de rato (L929). Queratinócitos bucais humanos primários foram obtidos a partir de tecido gengival saudável localizado ao redor de pré-molares extraídos por motivos ortodônticos. Fibroblastos bucais humanos primários foram obtidos a partir de estoques armazenados em nitrogênio líquido, sendo que essas células já haviam sido coletadas a partir de gengiva saudável localizada em torno de pré-molares hígidos extraídos por motivos ortodônticos. Células de fibroblastos permanentes de rato (linhagem L929) foram obtidas a partir do China Center para Type Culture Collection. Dois ensaios para avaliar a citotoxicidade desses produtos foram realizados. O primeiro foi o teste indireto de difusão em ágar, realizado como descrito nas normas internacionais. Também foi realizado o teste MTT e para isso foram obtidos extratos dos adesivos na concentração de 1% para os dois adesivos tipo creme e 0,5% para o adesivo tipo pó, por meio da diluição

destes produtos em meio de cultura DMEM. Os extratos foram incubados a 37°C numa atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Posteriormente, o extrato aquoso foi esterilizado por filtração, utilizando um filtro de 0,22 µm. O pH dos extratos foi monitorado utilizando-se tiras indicadoras de pH, e verificou-se que os valores permaneciam próximos ao pH neutro. Os resultados desse estudo demonstraram que todos os adesivos para prótese testados, apresentaram ligeira a moderada citotoxicidade sobre queratinócitos, enquanto que nenhum dos três adesivos foram tóxicos para as células L929, independentemente do ensaio utilizado. Para os fibroblastos humanos, uma ligeira citotoxicidade foi observada em um dos produtos a partir do teste de difusão em ágar, no entanto, para o teste MTT, todos os adesivos testados foram ligeiramente citotóxicos sobre essas células. Dessa forma, os autores concluíram a partir desse estudo que os adesivos foram citotóxicos para queratinócitos e fibroblastos humanos, enquanto que para as células L929 o mesmo não pode ser observado. Assim, os autores confirmam que diferentes tipos celulares podem apresentar diferentes graus de sensibilidade a testes de citotoxicidade, sendo que os resultados sugerem que as células primárias da mucosa oral de humanos podem fornecer informações valiosas em relação a citotoxicidade de adesivos para prótese.

Em 2014, foi avaliado por de Oliveira Júnior et al.<sup>18</sup> o efeito da utilização de dois adesivos para prótese em relação ao desempenho mastigatório de usuários de próteses totais convencionais, por meio de um estudo “cross-over”. Para isso, cinquenta pacientes desdentados totais receberam próteses totais bimaxilares novas e, após o período de adaptação posterior à instalação, foram submetidos à análise do desempenho mastigatório com as próteses sem adesivos para prótese. Em seguida, a amostra foi dividida aleatoriamente e designada a dois protocolos, nos quais a ordem de uso dos adesivos era diferente. Os adesivos Ultra Corega creme e Ultra Corega pó foram utilizados por 15 dias previamente à aplicação de novas análises do desempenho mastigatório por toda a amostra e respeitando-se um período de descanso (washout), também de 15 dias, entre o uso de cada adesivo. O desempenho mastigatório foi avaliado pelo método dos tamises. Foram observados aumento significativo do desempenho mastigatório após uso dos adesivos Ultra Corega creme (27,4%) e Ultra Corega pó (28,0%), quando estes foram comparados ao grupo controle (16,5%), não havendo diferença estatisticamente significante entre os adesivos testados. O uso de adesivos aumentou o desempenho mastigatório de usuários de próteses totais convencionais, e não houve diferença para o desempenho mastigatório quanto ao uso de adesivos nas formas de creme e pó.

Gonçalves et al.<sup>32</sup>, em 2014, avaliaram a influência do uso de adesivos para prótese sobre a função mastigatória em usuários de próteses totais com rebordos reabsorvidos e normais. Trinta pacientes edêntulos, utilizando próteses totais novas bem ajustadas, foram avaliados e alocados de acordo com o tipo de rebordo: normal ou reabsorvido. Antes e após aplicação dos adesivos (creme e fita) foram realizadas as avaliações da desempenho mastigatório por meio do método de peneiras, do padrão do ciclo mastigatório por meio de um cinesiógrafo e da habilidade mastigatória por meio de uma escala visual analógica. A utilização do adesivo para prótese aumentou o desempenho e a habilidade mastigatória em ambos tipos de rebordo. Melhor desempenho mastigatório e menor tempo de ciclo mastigatório foi observado nos pacientes com rebordos reabsorvidos quando utilizaram o adesivo tipo creme, seguido do adesivo fita e do baseline (sem a utilização de adesivo). Para os pacientes com rebordos normais, a utilização dos adesivos, independentemente do tipo, reduziu os valores de médios das partículas mastigadas, indicando melhor função mastigatória. O tipo do rebordo não alterou a função mastigatória em nenhum dos parâmetros avaliados. Assim, foi concluído pelos autores que os adesivos para prótese melhoram a mastigação reduzindo o ciclo mastigatório e aumentando a capacidade e desempenho mastigatório.

Leite et al.<sup>49</sup>, em 2014, avaliaram a influência de um adesivo para prótese (Ultra Corega creme) na formação de biofilme sobre a superfície interna de próteses totais e na microbiota bucal, no grau de satisfação, além da estimativa de custo médio diário do produto. Trinta pacientes após receberem próteses totais novas foram divididos em dois protocolos. No protocolo 1 utilizaram o adesivo durante os primeiros 15 dias de teste, seguida por não utilização de nenhum tipo de adesivo durante os próximos 15 dias; no protocolo 2 não utilizaram o adesivo durante os primeiros 15 dias de teste, seguida por utilização do adesivo durante os próximos 15 dias. Após cada período de 15 dias, o biofilme formado na superfície interna das próteses totais foi corado e quantificado por meio de um método fotográfico com o auxílio de um software (Image Tool 3.00). Amostras de material da mucosa palatina e da superfície interna das próteses superiores foram plaqueadas em meios seletivos para *Candida spp.* e *Streptococcus mutans* e em um meio não seletivo. Ainda, foi aplicado um questionário para avaliação da satisfação com as próteses e o custo médio diário do produto foi estimado por meio de fórmulas matemáticas. Verificou-se que houve formação de biofilme semelhante com ou sem o uso do adesivo sobre as próteses superiores e inferiores. As contagens de colônias também foram semelhantes com ou sem a utilização do adesivo na mucosa e na superfície interna da prótese total superior. Os pacientes relataram que o uso do adesivo

proporcionou maior satisfação com as próteses. O estudo demonstrou que, em média, cada paciente utilizou  $3,9 \pm 0,3$  gramas de adesivo por dia, o que equivale a R\$ 4,02 de custo médio diário. Conclui-se que a utilização do adesivo no período proposto não influenciou na quantificação do biofilme e na microbiota bucal, além de proporcionar maior satisfação geral.

Marin et al.<sup>53</sup>, em 2014, avaliou o efeito da utilização de um adesivo para prótese (Ultra Corega creme) na satisfação e nos parâmetros cinesiográficos em usuários de próteses totais por meio de um estudo “cross-over”. Cinquenta pacientes desdentados receberam novas próteses totais bimaxilares. Após um período de adaptação, os participantes incluídos no estudo receberam uma sequência de tratamento: protocolo 1- utilização do adesivo para prótese durante os primeiros 15 dias, seguida por não utilização do adesivo os próximos 15 dias; protocolo 2- não utilização do adesivo durante os primeiros 15 dias; seguida por utilização do adesivo os próximos 15 dias. Os resultados foram avaliados após 15 dias de cada sequência de tratamento. Um questionário para avaliar a satisfação dos pacientes e um cinesiógrafo para registrar os movimentos mandibulares e o padrão de movimento da prótese total maxilar durante a mastigação foram utilizados.. O adesivo para prótese melhorou significativamente a satisfação geral dos participantes. Os registros cinesiográficos mostraram um aumento significativo (1,7mm) no movimento mandibular vertical e uma menor intrusão (0,3mm) da prótese total superior durante a mastigação após o uso de adesivo. O uso de adesivo para prótese melhorou a satisfação dos usuários de próteses totais e gerou um aumento no movimento mandibular vertical e uma menor intrusão da prótese total maxilar durante a mastigação.

Harada-Hada et al.<sup>37</sup> (2015) desenvolveram um índice para avaliar a remoção de adesivos para prótese e a eficiência da limpeza de higienizadores para prótese. Cinco higienizadores para prótese foram avaliados quanto a sua eficiência para remoção de diferentes adesivos. Após imersão nas soluções de higiene (3, 6, 12 ou 24 horas), a área da prótese coberta com adesivo remanescentes foi visualmente classificada em uma escala de 0-5. Os adesivos tipo creme foram completamente removidos após imersão na maioria das soluções do que em água. O pó foi mais facilmente removido que o creme. O adesivo tipo fita não foi removido após imersão nas soluções de higiene. O estudo concluiu que a composição das soluções higienizadoras podem afetar a dissolução dos adesivos tipo creme, mas não o pó e a fita.

Lee et al. (2015) avaliaram a citotoxicidade de quatro adesivos para prótese. Fibroblastos gengivais humanos imortalizados foram cultivados em contato com extratos dos

adesivos em uma concentração de 10% (Polident, Protefix, Staydent ou Denfix-A) por 48 h. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio MTT, a taxa de apoptose por meio de citometria de fluxo e a morfologia celular por meio de MEV. Todos os adesivos para prótese diminuíram a viabilidade celular. Os adesivos Staydent e Protefix apresentaram taxas de apoptose significativamente maiores que o controle. Diminuição da membrana citoplasmática e fragmentos de células foram observadas por meio da microscopia para o adesivo Staydent. Os quatro adesivos avaliados neste estudo conferiram efeitos citotóxicos aos fibroblastos, especialmente o adesivo Staydent.

Uma revisão sistemática sobre a eficácia, biocompatibilidade e atitudes de profissionais e pacientes em relação aos adesivos para prótese foi publicada por Papadiochou et al.<sup>63</sup>, em 2015. Para isso, uma pesquisa eletrônica no banco de dados Medline foi conduzida, sem limitação de ano, até março de 2014. Trinta e dois artigos foram revisados, sendo que 21 analisaram a eficácia dos adesivos para prótese em termos de retenção, estabilidade e desempenho mastigatório, 6 avaliaram a biocompatibilidade desses produtos e 5 apresentaram as atitudes de profissionais ou pacientes com relação a esses materiais. A maioria dos estudos clínicos observou que os adesivos aumentam a retenção, estabilidade e desempenho mastigatório de próteses totais. Em termos de biocompatibilidade, faltam estudos *in vivo* para investigar potenciais efeitos nocivos desses produtos. Em geral, usuários de próteses totais estão satisfeitos com os adesivos.

Abdelnabi et al.<sup>1</sup> (2016) avaliaram por meio de um ensaio clínico cross-over os tempos de oclusão e desocclusão de um adesivo para prótese totais (Corega creme). Realizou-se uma análise oclusal computadorizada (T-Scan III) e uma avaliação de retenção e estabilidade (Índice de Kapur) de 49 usuários de próteses totais novas confeccionadas convencionalmente sem e com a utilização de adesivos. A aplicação de adesivo resultou em melhora significativa na estabilidade e retenção e uma diminuição significativa na duração de todos os parâmetros oclusais. Os adesivos diminuíram significativamente o tempo de oclusão e o tempo de desocclusão em próteses totais inicialmente bem ajustadas com oclusão equilibrada, além de proporcionar maior estabilidade e simultaneidade de contato oclusal.

Darwish e Nassani<sup>15</sup> (2016) avaliaram a rugosidade de bases de resina acrílica para prótese total após contato com adesivos. Para isso, espécimes (n=10) confeccionados com as resinas polimetilmetacrilado e uretano dimetacrilato foram imersos em soluções de adesivos para prótese (1g de adesivo / 10ml de água destilada) por 16 horas por dia durante 30 dias a 37°C. A rugosidade dos espécimes foi mensurada por meio de um rugosímetro antes e depois da imersão. A maioria dos adesivos avaliados não influenciaram a rugosidade dos espécimes.

Apenas o adesivo Corega creme aumentou significativamente a rugosidade de ambos espécimes.

Harada-Hada et al.<sup>38</sup> (2016) avaliaram a eficácia da remoção de adesivos para prótese e de biofilme de *Candida albicans* após adição de celulase (Meiselase) em limpadores de prótese totais. Espécimes de resina acrílica com adesivo espalhados uniformemente em sua superfície foram imersos em soluções preparadas com limpadores para prótese, água aquecida e Meiselase (0,1 e 0,5%) durante 1, 3, 6, 12 e 24 horas. Após cada período, os espécimes foram removidos e classificados visualmente quanto a quantidade de remanescente adesivo em sua superfície (Escala 0-5). Para avaliação da remoção do biofilme, biofilme de *Candida albicans* foi formado sobre espécimes de resina acrílica e então, submersos por 6h em uma solução de Meiselase a 0,1% em temperatura ambiente. Em seguida, para determinar a viabilidade das leveduras do biofilme residual foi mensurada a quantidade total adenosina trifosfato (ATP) por meio de um equipamento de bioluminescência. Foi observado pelos autores que a adição da celulase acelerou a remoção de adesivos tipo creme. No entanto, não influenciou a remoção de biofilmes de *Candida albicans* de espécimes de resina acrílica.

A eficácia de diferentes métodos de higienização na remoção de um adesivo para prótese total (Ultra Corega creme) e na redução da carga microbiana oral foi avaliada por Nunes et al.<sup>59</sup>, em 2016. Para isso, os métodos de higienização avaliados foram a escovação das próteses com escova de cerdas macias utilizando: A (água em temperatura ambiente), B (água em temperatura ambiente + sabão de coco), C (água em temperatura ambiente + dentífrício) e D (água + imersão em solução de perborato de sódio por 5 minutos). Foi realizada coleta de saliva de 20 pacientes usuários de próteses totais antes e após a utilização do adesivo e realização dos métodos de higienização. As superfícies internas das próteses totais superiores foram coradas com índigo carmim 0,4% e as áreas cobertas por adesivo foram quantificadas (%) por meio de um método fotográfico e auxílio de um software (Image Tool). Para a análise microbiológica, a saliva coletada foi diluída e plaqueada em um meio de cultura não-seletivo (Mueller Hintön Agar) e em meios de cultura para *Candida spp* (Sabouraud Dextrose Agar e CHROMagar). Após o período de incubação (48 horas/37°C), as espécies de *Candida* foram identificadas e o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram calculados. Conclui-se que a escovação combinada com a imersão das próteses em perborato de sódio foi mais eficaz na remoção do adesivo quando comparado com a escovação com água. Para os meios de cultura não seletivo e seletivos para *Candida spp*, não foi observada influência dos métodos de higienização na carga microbiana oral.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e produção de mediadores inflamatórios de diferentes adesivos para prótese, além de identificar os possíveis componentes responsáveis por esses efeitos.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

1 - Avaliar a viabilidade celular por meio do ensaio MTT, a análise da integridade da membrana celular por meio da liberação de LDH, e a morfologia celular por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de diferentes adesivos para prótese sobre cultura de queratinócitos gengivais humanos.

2 - Avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias sobre cultura de queratinócitos por meio do Ensaio Imunoabsorbente de Ligação Enzimática (ELISA).

3 - Identificação do ácido maleico e formaldeído nos extratos obtidos dos adesivos por meio de cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chamas (CG/DIC).

Diante dessas informações a hipótese nula do presente estudo foi que o tipo de adesivo e tempo de exposição das células aos adesivos não tem influencia sobre a viabilidade celular, integridade da membrana e produção de citocinas.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Avaliação da Citotoxicidade de Extratos de Diferentes Adesivos para Prótese Total

#### 4.1.1 Cultura e manutenção das células<sup>21,41</sup>

O efeito citotóxico de diferentes adesivos para prótese foi avaliado pelo método de cultura de células. Dessa forma, a linhagem celular imortalizada de queratinócitos humanos oriundos de tecido gengival<sup>10</sup> (NOK-SI) foram propagados em Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina - Gibco, NY, EUA). O cultivo das células foi realizado em garrafas para culturas de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO<sub>2</sub> (Costar, CorningIncorporated, Corning, NY, EUA). Essas garrafas foram incubadas em estufa para cultura de células (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA) com 5% de CO<sub>2</sub>, à temperatura de 37°C e ambiente com umidade controlada.

Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novos frascos após períodos de três dias de incubação, antes de se realizar o teste de citotoxicidade. Para isso, foi colocado 7 mL de tripsina e levadas a estufa para cultura de células por 10 minutos com a finalidade de desagregar as células da parede do fundo do frasco e obter uma suspensão. Após esse período foi adicionado 7 mL de meio de cultura DMEM 10% e centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 5 mL. Dessa suspensão de células, cada 1 mL foi colocado em nova garrafa, sendo acrescidos 14 mL de meio de cultura suplementado, com o auxílio de uma pipeta graduada e um pipetador automático. Cada garrafa foi, então, tampada e levada à estufa para a formação de nova confluência de células. É importante salientar que todos os procedimentos foram realizados em área asséptica dentro da capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70%.

#### 4.1.2 Quantificação das células<sup>21,41</sup>

Para a realização do teste de citotoxicidade, uma suspensão de  $7,0 \times 10^4$  células/mL de meio de cultura foi preparada. Para isso, as células foram descoladas do fundo da garrafa

colocando-se 7 mL tripsina e levadas a estufa para cultura de células por 10 minutos. Após esse período foi adicionado 7 mL de meio de cultura DMEM 10% e centrifugados em uma centrífuga especial autobalanceável (Fanem Ltda, São Paulo, SP, Brasil) por 5 minutos a 2000 rpm. Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina - Gibco, NY, EUA), foi acrescentado e as células misturadas a ele. A partir daí, 100 µL foram retirados e adicionados a 100 µl de corante azul de Tripan (Merck - Indústrias Químicas Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Dessa solução, 10 µL foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburg, Alemanha) onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico (Nikon, modelo YS 100, Tokyo, Japão) com aumento de 40x. Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de interesse ( $7 \times 10^3$  células/mL de meio de cultura para o ensaio MTT e CytoTox-One®;  $5 \times 10^4$  células/mL para o ensaio MEV;  $3,5 \times 10^5$  células/mL para o ensaio ELISA) para posterior utilização nos experimentos.

#### 4.1.3 Obtenção dos extratos

Foi realizado a diluição dos adesivos Ultra Corega® creme, Corega® Pó e Corega® fita adesiva (Colgate-Palmolive Industrial Ltda., São Bernardo, SP, Brasil) na concentração final de 1% em meio de cultura DMEM<sup>17</sup>, e incubados à 37°C por um período de 24 horas (Tabela 1)<sup>3,11,23</sup>.

**Tabela 1** – Adesivos e componentes disponibilizados nas embalagens dos produtos

Tipo de adesivo	Componentes
Corega creme	Sais de sódio/cálcio de poli (Metilviniléter / Ácido Maleico), carboximetilcelulose, óleo mineral, vaselina.
Corega pó	Sais de sódio/cálcio de poli (Metilviniléter / Ácido maleico), Carboximetilcelulose, e Aroma.
Corega fita	Carboximetilcelulose de Sódio, Cera Microcristalina, Polibutileno, Polietilenoglicol.

Fonte: Elaboração própria.

Após esses períodos, as suspensões foram centrifugadas por 15 minutos e 3000 rpm e

esterilizadas por filtração<sup>3,11,17</sup>. As suspensões foram esterilizadas pois os adesivos são produtos não estéreis, dessa forma, a possível presença de microrganismos<sup>23,70</sup> poderia induzir leituras incorretas nas pontuações de citotoxicidade neste estudo<sup>23</sup>. Uma contaminação microbiana na cultura celular inviabilizaria a sua utilização, visto que os microrganismos competiriam pelos nutrientes do meio fazendo com que as células morressem pela falta de alimento<sup>11,17,23</sup>. Além disso, os microrganismos metabolizariam o meio de forma a torná-lo excessivamente ácido para determinadas linhagens celulares. A técnica de esterilização por filtração foi empregada pois é utilizada em laboratórios de microbiologia e na indústria farmacêutica em substâncias que não podem ser esterilizadas por autoclave, pois poderiam sofrer alteração por calor. Nestes casos, convém dispor-se de dispositivo para filtração por membranas, sendo esterilizadas com um filtro especial de acetato de celulose com porosidade inferior a 0,22  $\mu\text{m}$ <sup>11</sup>.

#### **4.1.4 Avaliação quantitativa MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazoliumbromido)<sup>21</sup>**

Por esta técnica, o sal metiltetrazolium (MTT) foi incorporado à cultura de células. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebrou a estrutura do sal tetrazolium, produzindo cristais de formazan cor azul, determinando, dessa forma, valores relativos à intensidade da cor azul em espectrofotômetro específico com comprimento de onda determinado. Quanto maior a atividade mitocondrial, maior a intensidade da luz azul e, assim, maior o número de células viáveis. Para a realização do teste, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão composta de  $7,0 \times 10^3$  células/mL, foram colocados em cada compartimento de uma placa com 96 orifícios (TPP, Trasadingen, Suíça), incubada em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C por 24 horas. Após tal período de incubação, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa, e 100  $\mu\text{L}$  do extrato contendo as substâncias liberadas pelos adesivos, a qual foi incubada por 3, 6 e 24 horas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ , à temperatura de 37°C. Para cada grupo experimental, foram destinados oito compartimentos da placa. Oito orifícios da placa não receberam o extrato e receberam apenas 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura novo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina (100 UI/mL de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina), servindo, assim, como grupo controle negativo. Outros oito orifícios receberam 100  $\mu\text{L}$  de Dimethyl Sulfóxido (DMSO; pureza  $\geq 99,9\%$ ; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) servindo, assim, como grupo controle positivo.

Após o período de incubação de 3, 6 e 24 horas, 30  $\mu$ l da solução de sal metiltetrazolium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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, 100  $\mu$ l de solução solubilizadora de MTT foram adicionados a cada orifício da placa a qual foi agitada levemente até ocorrer a dissolução dos cristais de formazan. Posteriormente, a análise da atividade mitocondrial foi realizada em espectrofotômetro Reader 400 EZ (Biochrom, Cambridge, UK) com comprimento de onda de 562 nm. É importante ressaltar, também, que todos os procedimentos foram realizados três vezes em dias diferentes. Dessa forma, cada condição experimental ficou com um número de 24 poços. Na Figura 1 podemos observar placa 96 poços após leitura em espectrofotômetro e equipamento Reader 400 EZ.

**Figura 1** – Placa após mensuração da densidade óptica e equipamento espectrofotômetro



Fonte: Elaboração própria.

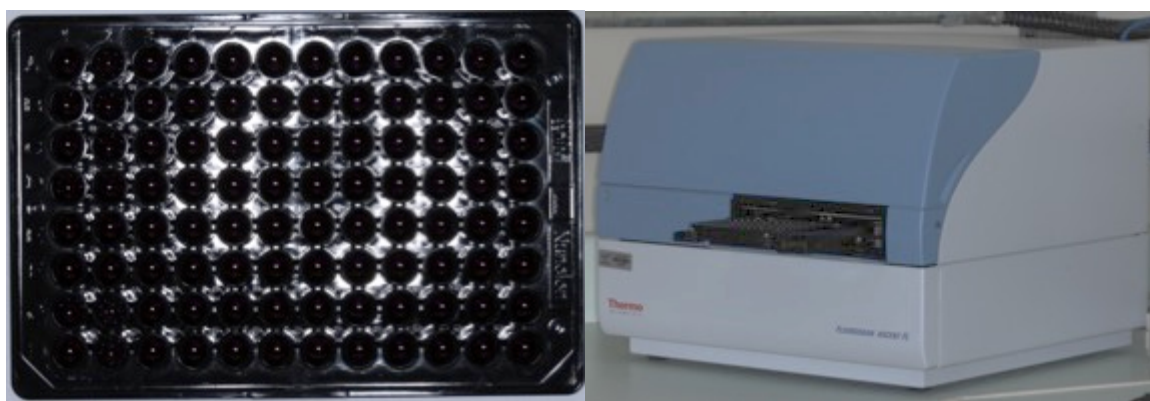
A viabilidade celular foi obtida pela divisão dos valores das densidades ópticas dos poços experimentais por aqueles do controle negativo e multiplicando-se por 100. Os adesivos foram classificados de acordo com a ISO 10993-5<sup>40</sup>: 0 - não citotóxico (viabilidade celular superior a 75%), 1 - ligeiramente citotóxica (entre 75% e 50% de viabilidade celular), 2 - moderadamente citotóxica (entre 50% e 25% de viabilidade) e 3 - fortemente citotóxica (viabilidade celular inferior a 25%).

#### 4.1.5 Análise da integridade da membrana<sup>19</sup>

A análise da integridade da membrana celular foi realizada por meio do reagente CytoTox-One® (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA), que mede a liberação da enzima LDH (lactato desidrogenase). A liberação desta enzima indica a presença de dano substancial à membrana das células. A partir do teste, a produção do produto fluorescente é

proporcional à quantidade de LDH liberada. Para realização do experimento (n=4; em triplicata), após os períodos de exposição das células aos extratos, 100 µl dos sobrenadantes celulares foram coletados e adicionados a uma placa preta de 96 orifícios própria para o kit utilizado (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Em seguida, 100 µl do reagente CytoTox-One® foram adicionados a cada orifício da placa de cultura. Depois de uma breve agitação, a placa foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a placa foi agitada por 10 segundos e a fluorescência (560 nm de excitação, 590 nm de emissão) foi mensurada utilizando o leitor FluoroskanAscent™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA)<sup>19,21</sup>. Na Figura 2 podemos observar uma placa após mensuração da fluorescência e o equipamento FluoroskanAscent™.

**Figura 2** – Placa após mensuração da fluorescência e equipamento FluoroskanAscent™



Fonte: Elaboração própria.

#### 4.1.6 Avaliação da morfologia celular por MEV

Um microscópio eletrônico de varredura foi utilizado para avaliação da morfologia celular, para isso, compartimentos (n=2) representativos dos grupos experimentais e controle negativo foram utilizados em placas de 24 poços. Antes do cultivo das células, lamínulas de vidro previamente esterilizadas com 13 mm de diâmetro foram posicionadas no fundo dos compartimentos. Após o período de adesão celular ( $5 \times 10^4$  células/mL de meio de cultura), e após as células serem incubadas em contato com os extratos por 3, 6 e 24h, estes foram aspirados e as células que permanecerem aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas por uma hora em 500 µL de glutaraldeído tamponado a 2,5% em temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas com 500µL de PBS, por três vezes. Foi realizada a desidratação em soluções crescentes de etanol (1 x 70% por 1 h; 1 x 90% por 1 hora; 5 x 100% por 30 minutos cada). Em seguida, as lamínulas foram mantidas em recipientes por 7 dias no dessecador á vácuo com sílica. Após dessecadas, foram fixadas em stubs metálicos (suporte porta-amostra

do MEV), foram metalizadas com ouro para promover o aumento da condutividade da superfície da amostra, e então analisadas em MEV JEOL JSM-6610LV para determinação da morfologia celular (JEOL Ltd., Akishima, Tokyo, Japão).

#### 4.2 Análise da Produção de Citocinas Pró-inflamatórias após Exposição aos Extratos dos Adesivos

A cultura celular e obtenção dos extratos já foram descritos anteriormente. Após incubação da cultura celular exposta aos extratos por 3, 6 e 24 horas, o sobrenadante foi coletado para quantificação das citocinas pró-inflamatórias<sup>55,72</sup>.

A análise dos mediadores inflamatórios IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , (n=6) foi realizada utilizando kits de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) disponíveis comercialmente (ELISA KIT, Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, EUA). Em uma placa de 96 poços disponível no kit, foram adicionados 50  $\mu$ L dos padrões, amostras e controles em seus respectivos poços e 100  $\mu$ L de biotina em todos os poços com exceção do poço destinado ao branco. A placa foi coberta e incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida os poços foram lavados por 4 vezes com *Wash Buffer* e adicionado 100  $\mu$ L de estraptavidina, exceto no poço destinado ao *Blank*. A placa foi incubada por 30 minutos, lavada 4 vezes, e foi adicionado em cada poço 100  $\mu$ L do cromógeno. A placa foi novamente incubada por 25 minutos no escuro, sendo em seguida adicionado 100  $\mu$ L do *Stop Solution*, levemente agitada e realizada a leitura da absorbância dos poços em leitor de microplacas ELISA a 450nm (Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA).<sup>72</sup> Os níveis de citocinas foram expressos em pg/mL, calculados a partir dos valores de referência obtidos com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes (n=6). Na Figura 3 podemos observar o Kit Elisa e a placa após adição do cromógeno, ambos referentes a citocina IL-6.

**Figura 3** – Kit Elisa referente a citocina IL-6 e placa após adição do cromógeno



### 4.3 Identificação de Ácido Maleico e Formaldeído nos Extratos dos Adesivos para Prótese<sup>79</sup>

Para a realização das análises de identificação de ácido maleico e formaldeído na composição dos adesivos foi utilizado cromatógrafo gasoso (GC-2010, Shimadzu, Tóquio, Japão), com detector de ionização de chamas (FID, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (400 mL/min Ar sintético; 40 mL/min Hidrogênio; 30 mL/min Makeup N<sub>2</sub>), cuja manipulação foi realizada com o auxílio do software Solutions v. 1.02 Workstation (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna capilar de sílica fundida não polar RTX-1 (30 m x 0,32 mm de diâmetro interno x 3 µm de espessura de filme) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA), com dimetilpolisiloxano como fase estacionária e hélio como gás de arraste a um fluxo constante (2,46 mL/min). Alíquotas das amostras (1 µL) foram injetadas em modo split (1:9) com tempo para eliminação do solvente igual a 3 minutos. As temperaturas do injetor e da interface do detector permaneceram em 250°C e 260°C respectivamente. A temperatura do forno foi mantida inicialmente a 50°C por 3 minutos, e, então, aumentada 30°C/min até atingir 180°C. Perfazendo um total de 9,83 minutos de análise.

A identificação de ácido maleico e formaldeído foi realizada com base na comparação entre os tempos de retenção dos extratos obtidos dos diferentes adesivos e os cromatogramas dos padrões autênticos do ácido maleico (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) e formaldeído (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA), injetados nas mesmas condições.<sup>79</sup> Os resultados dessa análise foram apresentados de forma descritiva.

### 4.4 Análise dos Resultados

Os resultados das variáveis do estudo (viabilidade celular, liberação de LDH e produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-6) foram tabulados e avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene), e submetidos ao teste Anova de dois fatores e post-hoc de Bonferroni. A produção de TNF-α foi apresentado descritivamente. A análise da morfologia celular e a identificação do ácido maleico e formaldeído dos adesivos foi realizada de forma descritiva. A análise estatística foi realizada por meio do programa SPSS for Windows (versão 15.0; SPSS Inc.), com nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

A Tabela 2 mostra o teste de ANOVA de dois fatores realizado a partir dos resultados das porcentagens de viabilidade celular para os diferentes grupos de adesivos e tempos de exposição, obtidos no ensaio MTT. Diferença significativa foi observada entre os tipos de adesivo (Grupos), períodos (Tempo) e interação dos fatores (Grupos\*Tempo).

**Tabela 2** - ANOVA a dois fatores para viabilidade celular

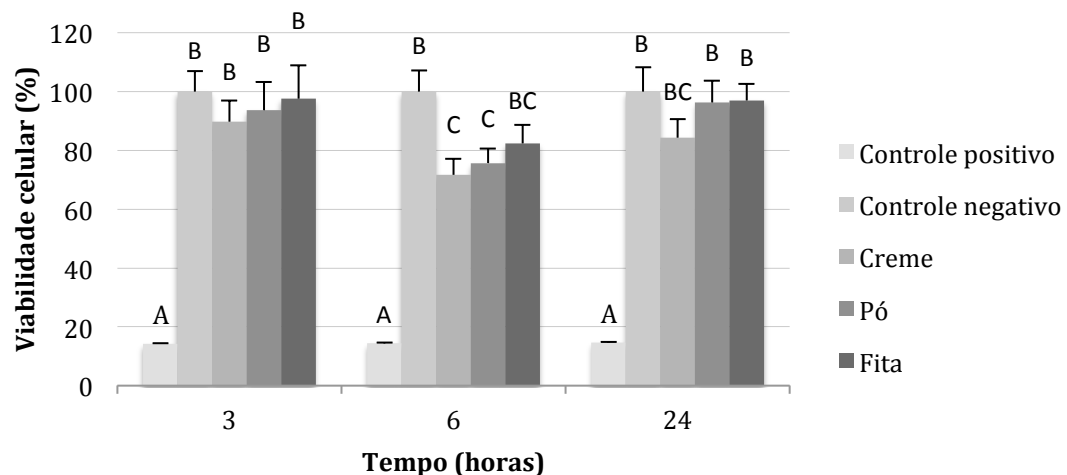
Origem	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	p
<b>Grupos</b>	4,092	4	1,023	268,583	0,000*
<b>Tempo</b>	0,149	2	0,074	19,513	0,000*
<b>Grupos * Tempo</b>	0,107	8	0,013	3,498	0,001*
<b>Erro</b>	1,314	345	0,004		

\*Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 4 identifica os grupos com diferenças significantes entre si para o ensaio MTT a partir do teste post-hoc de Bonferroni. Para os períodos 3 e 24 horas, não houve diferença significativa entre os materiais em relação ao controle negativo. Para o período 6 horas, as porcentagens de viabilidade celular obtidas com os extratos dos adesivos creme (71,6% de viabilidade celular, ligeiramente citotóxico,  $p = 0,000$ ) e pó (75,7%, não citotóxico,  $p = 0,002$ ) foram significativamente menores em comparação ao controle negativo.

**Figura 4** - Viabilidade celular (% do controle negativo) após a exposição das células a 3, 6 ou 24 horas dos extratos dos adesivos. Letras iguais representam semelhança estatística ( $p > 0,05$ )



Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 3 mostra os resultados do teste de ANOVA dois fatores para liberação de LDH nas diferentes condições experimentais. Diferença significativa foi observada entre os tipos de adesivo (Grupos).

**Tabela 3** - ANOVA de dois fatores para liberação de LDH

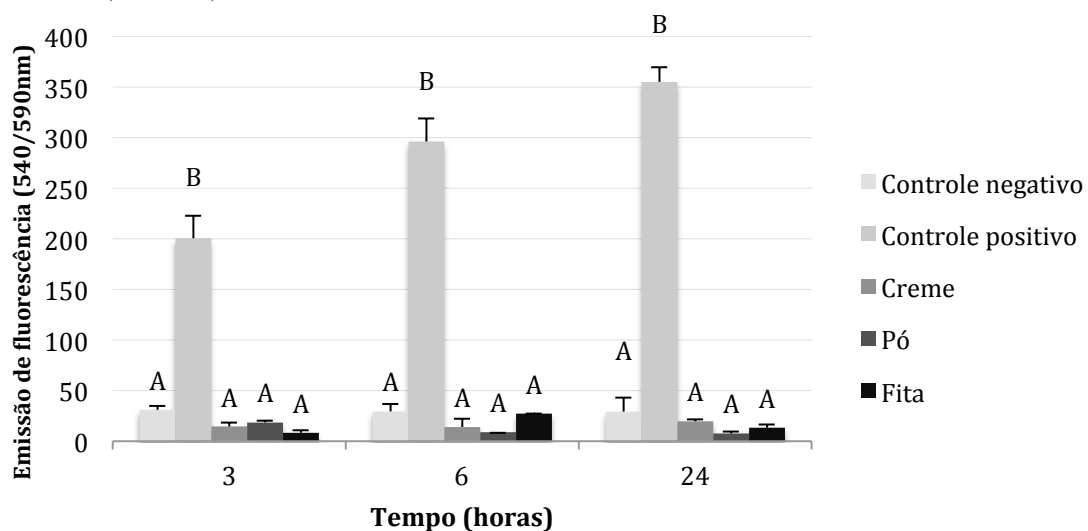
Origem	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	p
<b>Grupos</b>	648162,22	4	162040,555	10,832	0,000*
<b>Tempo</b>	17969,467	2	8984,733	0,601	0,555
<b>Grupos * Tempo</b>	56296,947	8	7037,118	0,47	0,867
<b>Erro</b>	448797,746	30	14959,925		

\*Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Elaboração própria.

Pela análise da integridade de membrana (Figura 5) pode ser observado que liberação de LDH foi semelhante entre todos os adesivos testados em relação ao controle negativo (DMEM 10%) nos diferentes períodos de exposição ( $p > 0,05$ ).

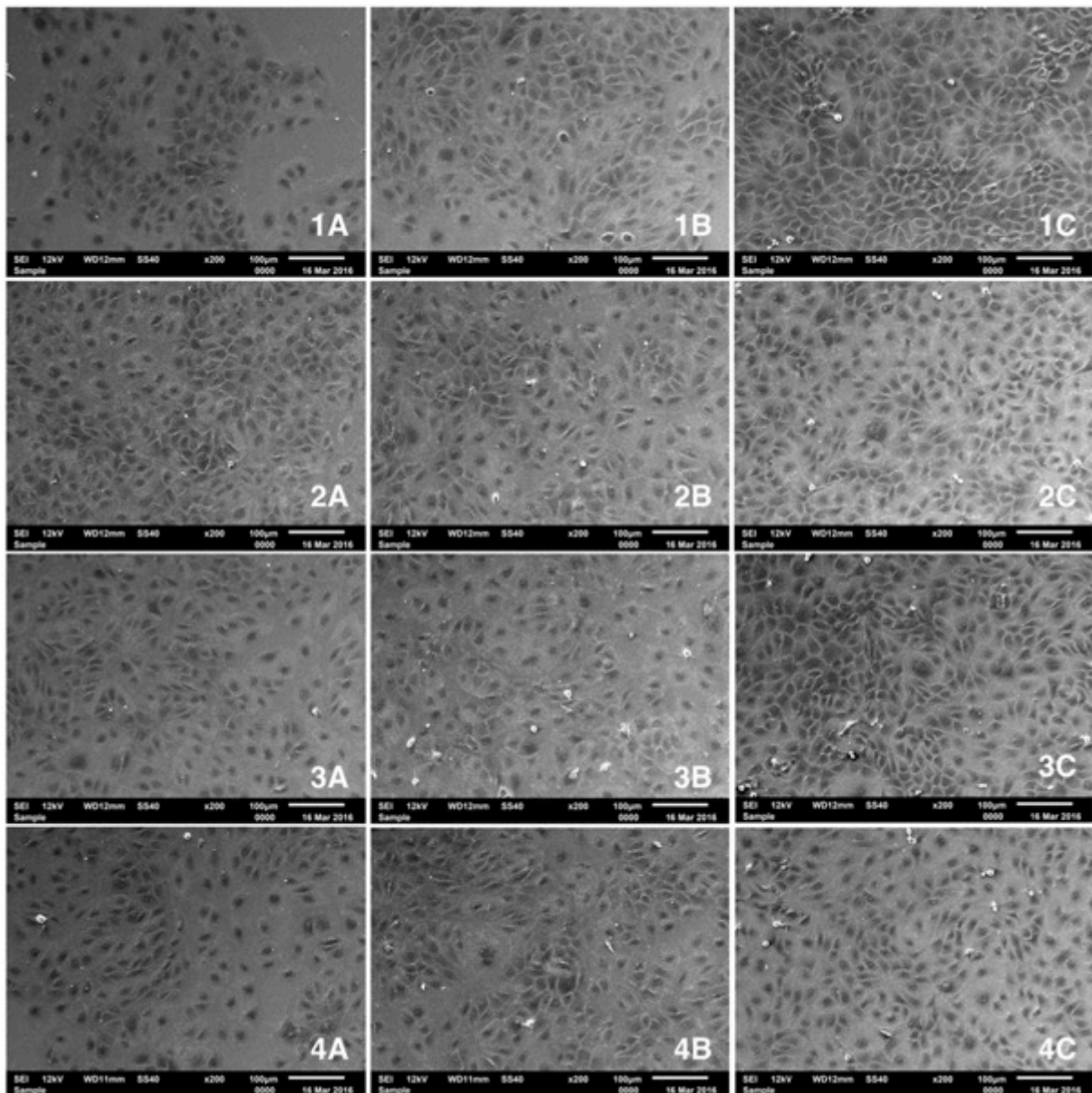
**Figura 5** - Média e desvio padrão da liberação de LDH por fluorescência (nm) pelas células NOK-SI, avaliada por meio do ensaio análise da integridade de membrana. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Teste ANOVA two-way e post-hoc de Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ )



Fonte: Elaboração própria

A Figura 6 refere-se à fotomicrografias representativas da morfologia celular das células NOK-SI dos controles negativos e após a exposição aos extratos dos adesivos obtidos nos períodos de 3, 6 e 24 horas, respectivamente.

**Figura 6** - Micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura das células NOK-SI após exposição ao meio de cultura DMEM 10% (1 – controle negativo) e aos extratos dos adesivos (2 – creme; 3 – pó; 4 – fita) nos diferentes períodos (A – 3 horas; B – 6 horas; 24 –horas), com aumento de 200x



Fonte: Elaboração própria.

Nas fotomicrografias dos controles (Imagens 1A, 1B e 1C), pode-se observar que as células recobrem a superfície do substrato de vidro e que a quantidade celular foi proporcional

ao tempo, estando próximas da confluência. Além disso, observa-se a morfologia celular poligonal e “cobblestone”, característica dos queratinócitos, e presença de mitoses. Nas imagens referentes às células expostas aos extratos dos adesivos avaliados, não foram observadas alterações significativas na morfologia.

A Tabela 4 mostra o resultado do teste ANOVA de dois fatores para expressão de IL-1 $\beta$ . Diferença significativa foi observada entre os períodos (Tempo) e interação dos fatores (Grupos\*Tempo).

**Tabela 4** - ANOVA de dois fatores para IL-1 $\beta$ .

Origem	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	p
<b>Grupos</b>	0,069	3	0,023	1,78	0,164
<b>Tempo</b>	0,179	2	0,09	6,933	0,002*
<b>Grupos * Tempo</b>	0,266	6	0,044	3,432	0,007*
<b>Erro</b>	0,608	47	0,013		

\*Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Elaboração própria.

A partir da Tabela 5 pode observar que, dentro do período 3 horas, uma maior produção da citocina IL-1 $\beta$  pode ser observada para o adesivo tipo fita ( $p = 0,016$ ). A produção da citocina IL-1 $\beta$  foi elevada para o adesivo tipo creme no período 24 horas em relação ao período 3 horas, assim como para o adesivo tipo pó nos períodos 6 e 24 horas. No entanto, dentro dos períodos 6 e 24h, esses adesivos apresentaram semelhança estatística em relação aos controles ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5** – Médias (desvios-padrão) da citocina IL-1 $\beta$  após exposição dos queratinócitos NOK-SI aos extratos dos adesivos 3, 6 e 24 horas

Grupos	Período		
	3h	6h	24h
<b>Controle</b>	0,175 (0,097) Aa	0,351 (0,022) Aa	0,281 (0,065) Aa
<b>Creme</b>	0,216 (0,149) Aab	0,359 (0,154) ABa	0,461 (0,030) Ba
<b>Pó</b>	0,130 (0,115) Aa	0,324 (0,128) Ba	0,384 (0,147) Ba
<b>Fita</b>	0,402 (0,195) Ab	0,344 (0,032) Aa	0,473 (0,030) Aa

Letras maiúsculas semelhantes nas linhas e letras minúsculas semelhantes nas colunas indicam semelhança estatística (ANOVA two-way, Bonferroni,  $\alpha = 0,05$ ).

Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 6 mostra o resultado do teste ANOVA dois fatores para a expressão da citocina IL-6, considerando os diferentes grupos de adesivos e períodos de exposição. Diferença significativa foi observada entre os tipos de adesivo (Grupos), períodos (Tempo) e interação dos fatores (Grupos\*Tempo).

**Tabela 6** - ANOVA dois fatores para citocina IL-6

<b>Origem</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>
<b>Grupos</b>	1307,127	3	435,709	24,842	0,000*
<b>Tempo</b>	17568,757	2	8784,379	500,834	0,000*
<b>Grupos * Tempo</b>	358,641	6	59,773	3,408	0,005*
<b>Erro</b>	1157,607	66	17,54		

\*Diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Elaboração própria.

Na Tabela 7, pode-se observar que a produção de IL-6 foi semelhante entre todos os grupos no período 3 h ( $p > 0,05$ ). Foi observado uma produção aumentada de IL-6 para os adesivos tipo creme e pó nos períodos 6 h ( $p = 0,001$ ;  $p = 0,007$ , respectivamente) e 24 h ( $p = 0,000$ ;  $p = 0,000$ ). Para todos os grupos a produção de IL-6 aumentou com o tempo ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7** - Médias (desvios-padrão) da citocina IL-6 após exposição dos queratinócitos NOK-SI aos extratos dos adesivos de 3, 6 e 24 horas

<b>Grupos</b>	<b>Período</b>		
	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>24h</b>
<b>Controle</b>	21,639 (2,039) Aa	36,923 (3,295) Ba	53,820 (3,390) Ca
<b>Creme</b>	27,107 (1,628) Aa	46,708 (8,899) Bc	66,647 (4,302) Cb
<b>Pó</b>	24,854 (1,144) Aa	45,229 (1,127) Bbc	66,329 (5,247) Cb
<b>Fita</b>	23,030 (1,044) Aa	39,440 (5,636) Bab	55,411 (2,768) Ca

Letras maiúsculas semelhantes nas linhas e letras minúsculas semelhantes nas colunas indicam semelhança estatística (ANOVA two-way, Bonferroni,  $\alpha = 0,05$ ).

Fonte: Elaboração própria.

Os dados sobre a liberação de TNF- $\alpha$  obtidos a partir do leitor de microplacas ELISA e traçando a curva padrão não foram detectáveis em alguns grupos e períodos (Tabela 8).

Assim, estão sendo apresentados de maneira descritiva. Observa-se que apenas os adesivos tipo pó (6 e 24h) e fita (24h) apresentaram uma pequena produção da citocina.

**Tabela 8** - Médias (desvios-padrão) da citocina TNF- $\alpha$  após exposição dos queratinócitos NOK-SI aos extratos dos adesivos de 3, 6 e 24 horas

Grupos	Período		
	3h	6h	24h
Controle	N.D.	N.D.	N.D.
Creme	N.D.	N.D.	N.D.
Pó	N.D.	1.124 (0.43)	1.473 (0.68)
Fita	N.D.	N.D.	1.633 (1.15)

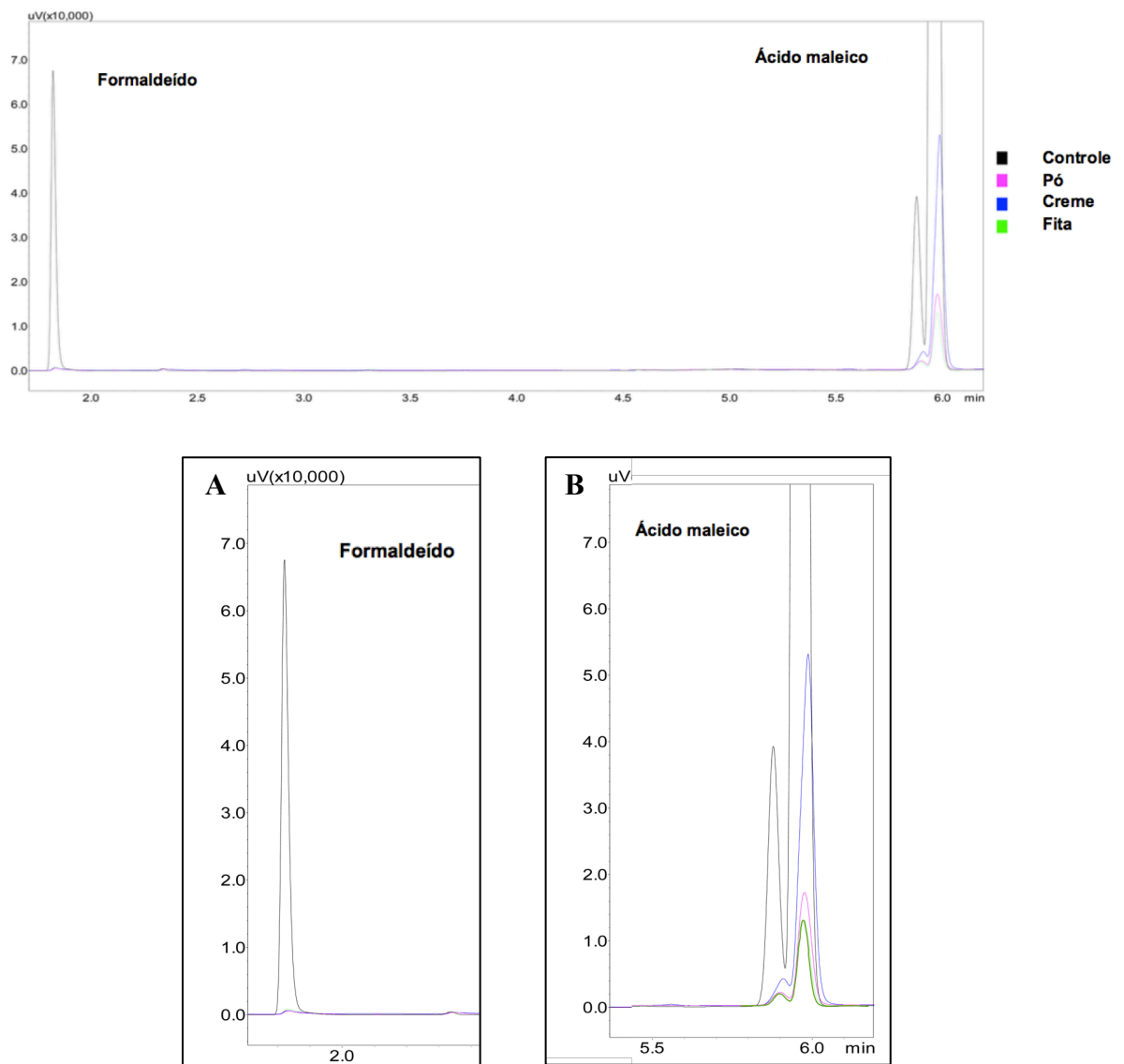
N.D. = não detectável

Fonte: Elaboração própria.

Na identificação do formaldeído e do ácido maleico, foram considerados dois parâmetros: o tempo de retenção e o fragmentograma, obtidos para cada um dos padrões injetados nas mesmas condições cromatográficas dos extratos dos adesivos.

Os perfis cromatográficos dos padrões formaldeído e ácido maleico, bem como dos extratos dos diferentes adesivos estão ilustrados na Figura 7. O ácido maleico (B) foi nitidamente detectado nos extratos de todos os adesivos, enquanto que pode-se observar sinais cromatográficos mínimos (A), porém presentes, do formaldeído.

**Figura 7** - Cromatogramas dos padrões formaldeído e ácido maleico e dos extratos obtidos dos diferentes adesivos injetados nas mesmas condições



Fonte: Elaboração própria.

## 6 DISCUSSÃO

A hipótese nula deste estudo foi parcialmente rejeitada, uma vez que o tipo de adesivo e o tempo exposição tiveram influência em algumas variáveis. Os adesivos tipo creme e pó diminuíram significante a viabilidade celular no período 6 horas, sendo classificados de acordo com a norma ISO 10993-5: 1999 (E)<sup>40</sup> em discretamente e não citotóxicos, respectivamente. Os queratinócitos não apresentaram sinais de danos significativos na membrana celular após a exposição aos extratos dos adesivos nas concentrações aplicadas neste estudo, como confirmado pelas imagens do MEV na análise de morfologia celular. Em geral, a quantidade e a morfologia das células aderidas ao substrato de vidro foram semelhantes aos achados observados no grupo controle e proporcionais ao tempo de exposição. Isso demonstra que, em alguns grupos, mesmo as células estando com a atividade mitocondrial diminuída, a membrana celular permaneceu preservada, uma vez que a liberação de LDH foi semelhante ao controle negativo.

Assim como este estudo, alguns outros estudos que avaliaram a citotoxicidade de diferentes marcas comerciais de adesivos verificaram variados níveis de citotoxicidade. Um estudo investigou o efeito citotóxico de 19 adesivos disponíveis comercialmente, por meio do teste de difusão em ágar na linha celular L929 (fibroblastos de ratos), e observou que todos os adesivos testados foram citotóxicos<sup>23</sup>. Al et al.<sup>3</sup>, em 2005, analisaram a citotoxicidade de cinco adesivos disponíveis comercialmente, e verificaram por meio do teste difusão em filtro e análise colorimétrica do metiltetrazolium (MTT) que um dos adesivos testados induziu uma reação fortemente citotóxica em células L929. Gomes et al.<sup>17</sup> verificaram que as dez marcas de adesivos testadas em fibroblastos da linhagem L929, por meio do teste MTT e observação da morfologia celular por microscopia confocal, apresentaram diferentes graus de citotoxicidade após incubação das culturas de células expostas aos extratos por 6, 12, 24 e 72 horas. Outros dois estudos observaram que uma marca de adesivo comercial e um adesivo recém-desenvolvido, respectivamente, foram citotóxicos para fibroblastos gengivais humanos<sup>20,87</sup>. Apenas Chen et al.<sup>11</sup>, em 2012, investigaram a citotoxicidade dos adesivos em queratinócitos gengivais humanos, além de fibroblastos gengivais humanos e fibroblastos L929, por meio dos testes difusão em ágar e MTT, e verificaram que no período de 24 horas os adesivos testados foram tóxicos para os queratinócitos, mas não para a linhagem L929. Este estudo corrobora que linhagens celulares distintas apresentam diferentes sensibilidades aos biomateriais, além de sugerir que células humanas da mucosa bucal fornecem

informações mais precisas em relação à citotoxicidade dos adesivos para prótese, além de serem as primeiras células a entrar em contato com os adesivos ou com os componentes lixiviados destes produtos<sup>11</sup>.

Efeito ligeiramente citotóxico foi observado após período de incubação intermediário (6 horas) para o adesivo creme. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores<sup>3,20</sup>, nos quais períodos mais curtos de 2 a 3 horas não produziram efeitos citotóxicos<sup>3,20</sup>, e períodos intermediários de incubação (6 horas) resultaram em efeitos citotóxicos<sup>20</sup>. Autores recomendam que adesivos para prótese sejam trocados várias vezes ao dia, possivelmente a fim de reduzir a exposição a possíveis agentes tóxicos que são liberados através da dissolução desses produtos para o meio bucal<sup>6</sup> e também para evitar seu acúmulo na superfície das próteses, que devido à viscosidade dos adesivos, poderiam aumentar a proliferação de microrganismos<sup>44</sup>. Ainda, estudos têm observado que uma das queixas mais recorrentes entre os usuários de adesivos para prótese é a sua dificuldade de remoção dos tecidos bucais e da prótese<sup>49,59,71,81</sup>, principalmente os adesivos tipo creme e pó<sup>35,71</sup>.

Contaminação microbiana tem sido encontrada em adesivos para prótese<sup>23,29,51</sup>, e a presença de microrganismos pode influenciar negativamente ensaios de citotoxicidade<sup>23</sup>. Por esta razão, optou-se por esterilizar por filtração os adesivos deste estudo, como já observado na literatura<sup>3,11,17</sup>. No presente estudo, a contaminação microbiana foi evitada. Assim, os componentes lixiviados do produto são provavelmente os agentes causadores da citotoxicidade observada<sup>3</sup>.

A diminuição da atividade mitocondrial e liberação de citocinas encontradas neste estudo, em algumas situações experimentais podem ter ocorrido devido à liberação de componentes adesivos. Alguns estudos relataram a dificuldade de identificar componentes responsáveis pela citotoxicidade desses produtos, tendo em vista que a composição e a concentração dos diferentes componentes são raramente disponibilizados pelos fabricantes<sup>11,17,87</sup>. A liberação de formaldeído, componente que exibe elevado nível de citotoxicidade, foi demonstrada por Ellis et al.<sup>24</sup> e Ekstrand et al.<sup>23</sup>. No estudo de Ekstrand et al.<sup>23</sup>, em 1993, uma determinação semiquantitativa de formaldeído presente em adesivos para prótese foi realizada e foi observado que quatro marcas comerciais de adesivos continham mais de 5 µL/ml de formaldeído. Outro estudo observou a presença de diazolidinil ureia na composição de um adesivo, que é um liberador de formaldeído, e poderia ter sido a causa da viabilidade celular significativamente menor e maiores taxas de apoptose encontradas<sup>48</sup>.

Tem sido observado na literatura que o formaldeído exibe um elevado nível de citotoxicidade e é responsável por reações alérgicas em pacientes que utilizam próteses

totais<sup>23,42,69</sup>. Níveis mínimos de formaldeído no cromatograma para todos os adesivos testados foram detectados em nosso estudo, sugerindo que o formaldeído não seja o componente responsável pelos nossos achados. Alguns autores sugeriram que menores níveis de citotoxicidade de certos adesivos poderiam estar associados à ausência de formaldeído<sup>20,48,87</sup>.

Efeito citotóxico severo na linhagem celular L-929 foi associado a presença de ácido maleico e metoxietileno na composição de um adesivo para prótese<sup>3</sup>. Outro estudo demonstrou a citotoxicidade do ácido maleico, dependente da concentração, em fibroblastos de hamster (linhagem V79)<sup>4</sup>. No presente estudo, a presença em maior quantidade de ácido maleico, demonstrada pelos picos no cromatograma também pode estar associada aos efeitos citotóxicos observados.

IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  são citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel importante nos processos inflamatórios e foram mensuradas neste estudo a fim de investigar uma possível ligação entre os adesivos para prótese e quaisquer efeitos biológicos adversos<sup>55,87</sup>. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que a produção de IL-1 $\beta$  foi aumentada em relação ao controle no período de exposição 3 horas para o adesivo fita, assim como a produção de IL-6 foi aumentada para os adesivos creme e pó nos períodos de 6 e 24 horas.

A citocina IL-1 $\beta$  é responsável por mediar a resposta inflamatória, promovendo o recrutamento de fagócitos, regulação de citocinas e produção de quimiocinas. Também promove reabsorção óssea, proliferação e diferenciação celular em resposta a estímulos inflamatórios<sup>31</sup>. A IL-6 está associada a processos inflamatórios e a resposta imunológica, incluindo a permeabilidade vascular, a diferenciação de osteoclastos e os mecanismos de regulação da reabsorção óssea. A desregulação da sua sinalização contribui para o aparecimento e manutenção de várias doenças, incluindo artrite reumatóide e osteoporose<sup>30,39</sup>. O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica envolvida na inflamação sistêmica e local, como a indução de mediadores inflamatórios, e é uma das mais importantes citocinas ativadoras de osteoclastos produzidas durante processos inflamatórios<sup>47</sup>, podendo apresentar-se em quantidades elevadas em algumas condições patogênicas e possuir potencial tóxico resultando em reações de hipersensibilidade com inflamação crônica<sup>75</sup>. Alterações nos níveis desses mediadores inflamatórios podem indicar respostas iniciais dos tecidos diferentes da toxicidade aguda e, dessa forma podem servir como indicadores de efeitos biológicos adversos dos adesivos utilizados comumente por usuários de próteses totais. Assim, aumento

na produção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6, como observado no presente estudo para alguns adesivos, são indicativos de resposta pró-inflamatória pelas células.

Uma das limitações dessa pesquisa poderia ser a baixa concentração utilizada dos adesivos, no entanto, concentrações maiores não puderam ser utilizadas devido ao fato que não seria possível filtrar esses produtos para eliminação da contaminação microbiana<sup>11</sup>. De qualquer forma, podemos sugerir que os adesivos para prótese utilizados neste estudo não são capazes de causar danos à membrana celular; porém influenciaram o metabolismo celular de forma discreta e a produção de citocinas importantes na regulação dos processos inflamatórios; e ainda demonstrou a presença do ácido maleico, um possível componente que pode ser o responsável por esses achados.

## 7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações do presente estudo, foi possível concluir que:

1) Os extratos dos adesivos tipo creme (3 e 24h), pó (3, 6 e 24h) e fita (3, 6 e 24h) não apresentaram efeitos citotóxicos; somente para o ensaio MTT o adesivo tipo creme, no período 6 horas, apresentou-se ligeiramente citotóxico.

2) Maior liberação da citocina IL-6 foi observada para os adesivos tipo creme e pó nos períodos 6 e 24h. No período 3 horas, maior liberação de IL-1 $\beta$  pôde ser observada para o adesivo fita.

3) Foi detectada, em diferentes níveis, a presença de ácido maleico e formaldeído nos adesivos testados.

## REFERÊNCIAS

1. Abdelnabi MH, Swelem AA, Al-Dharrab AA. Influence of denture adhesives on occlusion and disocclusion times. *J Prosthet Dent.* 2016; 115(3): 306-12.
2. Adisman IK. The use of denture adhesives as an aid to denture treatment. *J Prosthet Dent.* 1989; 62(6): 711-5.
3. Al RH, Dahl JE, Morisbak E, Polyzois GL. Irritation and cytotoxic potential of denture adhesives. *Gerodontology.* 2005; 22(3): 177-83.
4. Ballal NV, Kundabala M, Bhat S, Rao N, Rao BS. A comparative in vitro evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: root canal irrigants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108(4): 633-8.
5. Bartlett DW, Maggio B, Targett D, Fenlon MR, Thomas J. A preliminary investigation into the use of denture adhesives combined with dietary advice to improve diets in complete denture wearers. *J Dent.* 2013; 41(2): 143-7.
6. Berg E. A clinical comparison of four denture adhesives. *Int J Prosthodont.* 1991; 4(5): 449-56.
7. Berg E. Acceptance of full dentures. *Int Dent J.* 1993; 43(3 Suppl 1): 299-306.
8. Borges TeF, Mendes FA, de Oliveira TR, Gomes VL, do Prado CJ, das Neves FD. Mandibular overdentures with immediate loading: satisfaction and quality of life. *Int J Prosthodont.* 2011; 24(6): 534-9.
9. Budtz-Jørgensen E, Chung JP, Mojon P. Successful aging--the case for prosthetic therapy. *J Public Health Dent.* 2000; 60(4): 308-12.
10. Castilho RM, Squarize CH, Leelahavanichkul K, Zheng Y, Bugge T, Gutkind JS. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PloS one.* 2010; 5(5): e10503.
11. Chen F, Wu T, Cheng X. Cytotoxic effects of denture adhesives on primary human oral keratinocytes, fibroblasts and permanent L929 cell lines. *Gerodontology.* 2014; 31(1): 4-10.
12. Chew CL, Boone ME, Swartz ML, Phillips RW. Denture adhesives: their effects on denture retention and stability. *J Dent.* 1985; 13(2): 152-9.
13. Coates AJ. Denture adhesives: a review. *Aust Prosthodont J.* 1995; 927-31.
14. Coates AJ. Usage of denture adhesives. *J Dent.* 2000; 28(2): 137-40.
15. Darwish M, Nassani MZ. Evaluation of the effect of denture adhesives on surface roughness of two chemically different denture base resins. *Eur J Dent.* 2016; 10(3): 321-6.
16. de Baat C, van't Hof M, van Zeghbroeck L, Ozcan M, Kalk W. An international multicenter study on the effectiveness of a denture adhesive in maxillary dentures using disposable gnathometers. *Clin Oral Investig.* 2007; 11(3): 237-43.
17. de Gomes PS, Figueiral MH, Fernandes MH, Scully C. Cytotoxicity of denture adhesives. *Clin Oral Investig.* 2011; 15(6): 885-93.
18. de Oliveira Junior NM, Rodriguez LS, Mendoza Marin DO, Paleari AG, Pero AC, Compagnoni MA. Masticatory performance of complete denture wearers after using two adhesives: a crossover randomized clinical trial. *J Prosthet Dent.* 2014; 112(5): 1182-7.

19. Delben JA, Zago CE, Tyhovych N, Duarte S, Vergani CE. Effect of atmospheric-pressure cold plasma on pathogenic oral biofilms and in vitro reconstituted oral epithelium. *PloS one*. 2016; 11(5): e0155427.
20. DeVengencie J, Ng MC, Ford P, Iacopino AM. In vitro evaluation of denture adhesives: possible efficacy of complex carbohydrates. *Int J Prosthodont*. 1997; 10(1): 61-72.
21. Dias Kde C, Barbugli PA, Vergani CE. Influence of different buffers (HEPES/MOPS) on keratinocyte cell viability and microbial growth. *J Microbiol Methods*. 2016; 125:40-2.
22. Doundoulakis JH, Eckert SE, Lindquist CC, Jeffcoat MK. The implant-supported overdenture as an alternative to the complete mandibular denture. *J Am Dent Assoc*. 2003; 134(11): 1455-8.
23. Ekstrand K, Hensten-Pettersen A, Kullmann A. Denture adhesives: cytotoxicity, microbial contamination, and formaldehyde content. *J Prosthet Dent*. 1993; 69(3): 314-7.
24. Ellis B, Al-Nakash S, Lamb DJ. The composition and rheology of denture adhesives. *J Dent*. 1980; 8(2): 109-18.
25. Ellis JS, Pelekis ND, Thomason JM. Conventional rehabilitation of edentulous patients: the impact on oral health-related quality of life and patient satisfaction. *J Prosthodont*. 2007; 16(1): 37-42.
26. Emami E, Heydecke G, Rompré PH, de Grandmont P, Feine JS. Impact of implant support for mandibular dentures on satisfaction, oral and general health-related quality of life: a meta-analysis of randomized-controlled trials. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(6): 533-44.
27. Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Am Dent Assoc*. 2011; 142 Suppl:11S-20S.
28. Figueiral MH, Fonseca PA, Pereira-Leite C, Scully C. The effect of different adhesive materials on retention of maxillary complete dentures. *Int J Prosthodont*. 2011; 24(2): 175-7.
29. Gates WD, Goldschmidt M, Kramer D. Microbial contamination in four commercially available denture adhesives. *J Prosthet Dent*. 1994; 71(2): 154-8.
30. Ghandadi M, Sahebkar A. Curcumin: an effective inhibitor of interleukin-6. *Current pharmaceutical design*. 2016 [Epub ahead of print].
31. Gomes FI, Aragao MG, Barbosa FC, Bezerra MM, de Paulo Teixeira Pinto V, Chaves HV. Inflammatory cytokines interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha - novel biomarkers for the detection of periodontal diseases: a literature review. *Journal of oral & maxillofacial research*. 2016; 7(2): e2.
32. Goncalves TM, Viu FC, Goncalves LM, Garcia RC. Denture adhesives improve mastication in denture wearers. *Int J Prosthodont*. 2014; 27(2): 140-6.
33. Grasso JE. Denture adhesives: changing attitudes. *J Am Dent Assoc*. 1996; 127(1): 90-6.
34. Grasso JE. Denture adhesives. *Dent Clin North Am*. 2004; 48(3): 721-33, vii.
35. Grasso JE, Rendell J, Gay T. Effect of denture adhesive on the retention and stability of maxillary dentures. *J Prosthet Dent*. 1994; 72(4): 399-405.
36. Grone A. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2002; 88(1-2): 1-12.
37. Harada-Hada K, Hong G, Abekura H, Murata H. Evaluation of the efficiency of denture cleaners for removing denture adhesives. *Gerodontology*. 2016; 33(4): 453-60.

38. Harada-Hada K, Mimura S, Hong G, Hashida T, Abekura H, Murata H, et al. Accelerating effects of cellulase in the removal of denture adhesives from acrylic denture bases. *J Prosthodont Res*. 2016 [Epub ahead of print].
39. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*. 2003; 374(Pt 1): 1-20.
40. International Organization for Standardization: ISO 10993-5:1999 (E) Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2nd ed. G eneve: ISO; 1999.
41. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont*. 2004; 17(3): 340-4.
42. Kallus T. Enhanced tissue response to denture base polymers in formaldehyde-sensitized guinea pigs. *J Prosthet Dent*. 1984; 52(2): 292-9.
43. Kelsey CC, Lang BR, Wang RF. Examining patients' responses about the effectiveness of five denture adhesive pastes. *J Am Dent Assoc*. 1997; 128(11): 1532-8.
44. Kim E, Driscoll CF, Minah GE. The effect of a denture adhesive on the colonization of *Candida* species in vivo. *J Prosthodont*. 2003; 12(3): 187-91.
45. Koronis S, Pizatos E, Polyzois G, Lagouvardos P. Clinical evaluation of three denture cushion adhesives by complete denture wearers. *Gerodontology*. 2012; 29(2): e161-9.
46. Kulak Y, Ozcan M, Arikan A. Subjective assessment by patients of the efficiency of two denture adhesive pastes. *J Prosthodont*. 2005; 14(4): 248-52.
47. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004; 15(1): 49-60.
48. Lee Y, Ahn JS, Yi YA, Chung SH, Yoo YJ, Ju SW, et al. Cytotoxicity of four denture adhesives on human gingival fibroblast cells. *Acta Odontol Scand*. 2015; 73(2): 87-92.
49. Leite AR, Mendoza-Marin DO, Paleari AG, Rodriguez LS, Roccia AA, Policastro VB, et al. Crossover clinical trial of the influence of the use of adhesive on biofilm formation. *J Prosthet Dent*. 2014; 112(2): 349-56.
50. Leles CR, Nakaoka MM, Souza RFd, Compagnoni MA. Estudo retrospectivo dos fatores associados   longevidade de próteses totais. Parte II - Tempo de uso e estimativa de durabilidade. *PGR: Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol.* . 1999; 249-56.
51. Makihira S, Nikawa H, Satonobu SV, Jin C, Hamada T. Growth of *Candida* species on commercial denture adhesives in vitro. *Int J Prosthodont*. 2001; 14(1): 48-52.
52. Ma es JF, Selva EJ, De-Barutell A, Bouazza K. Comparison of the retention strengths of three complete denture adhesives: an in vivo study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(1): e132-6.
53. Marin DO, Leite AR, Paleari AG, Rodriguez LS, Oliveira Junior NM, Pero AC, et al. Effect of a denture adhesive on the satisfaction and kinesiographic parameters of complete denture wearers: a cross-over randomized clinical trial. *Braz Dent J*. 2014; 25(5): 391-8.
54. Marin Zuluaga DJ, Gomez Velandia OC, Rueda Clauijo DM. Denture-related stomatitis managed with tissue conditioner and hard autopolymerising reline material. *Gerodontology*. 2011; 28(4): 258-63.
55. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater*. 2007; 23(1): 40-4.

56. Munoz CA, Gendreau L, Shanga G, Magnuszewski T, Fernandez P, Durocher J. A clinical study to evaluate denture adhesive use in well-fitting dentures. *J Prosthodont.* 2012; 21(2): 123-9.
57. Mutluay MM, Oguz S, Floystrand F, Saxegaard E, Dogan A, Bek B, et al. A prospective study on the clinical performance of polysiloxane soft liners: one-year results. *Dent Mater J.* 2008; 27(3): 440-7.
58. Nicolas E, Veyrune JL, Lassauzay C. A six-month assessment of oral health-related quality of life of complete denture wearers using denture adhesive: a pilot study. *J Prosthodont.* 2010; 19(6): 443-8.
59. Nunes EM, Policastro VB, Scavassin PM, Leite AR, Mendoza Marin DO, Giro G, et al. Crossover clinical trial of different methods of removing a denture adhesive and the influence on the oral microbiota. *J Prosthet Dent.* 2016; 115(4): 462-8.
60. Oliveira MC, Oliveira VM, Vieira AC, Rambob I. In vivo assessment of the effect of an adhesive for complete dentures on colonisation of *Candida* species. *Gerodontology.* 2010; 27(4): 303-7.
61. Ozcan M, Kulak Y, Arikan A, Silahtar E. The attitude of complete denture wearers towards denture adhesives in Istanbul. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(2): 131-4.
62. Ozkan YK, Uçankale M, Ozcan M, Uner N. Effect of denture adhesive on the microorganisms in vivo. *Gerodontology.* 2012; 29(1): 9-16.
63. Papadiochou S, Emmanouil I, Papadiochos I. Denture adhesives: a systematic review. *J Prosthet Dent.* 2015; 113(5): 391-7 e2.
64. Pero A, Paleari A, Rodriguez L, Leite A, Roccia A, Compagnoni M. Avaliação subjetiva do uso de adesivos por portadores de próteses totais bimaxilares em uma população brasileira. *Rev Odontol UNESP.* 2012; 41(1): 38-42.
65. Polyzois G, Niarchou A, Ntala P, Pantopoulos A, Frangou M. The effect of immersion cleansers on gloss, colour and sorption of acetal denture base material. *Gerodontology.* 2013; 30(2): 150-6.
66. Psillakis JJ, Wright RF, Grbic JT, Lamster IB. In practice evaluation of a denture adhesive using a gnathometer. *J Prosthodont.* 2004; 13(4): 244-50.
67. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(1): 99-116.
68. Redford M, Drury TF, Kingman A, Brown LJ. Denture use and the technical quality of dental prostheses among persons 18-74 years of age: United States, 1988-1991. *J Dent Res.* 1996; 75 Spec No714-25.
69. Ruyter IE. Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand.* 1980; 38(1): 17-27.
70. Sampaio-Maia B, Figueiral MH, Sousa-Rodrigues P, Fernandes MH, Scully C. The effect of denture adhesives on *Candida albicans* growth in vitro. *Gerodontology.* 2012; 29(2): e348-56.
71. Sato Y, Kaiba Y, Hayakawa I. Evaluation of denture retention and ease of removal from oral mucosa on a new gel-type denture adhesive. *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi.* 2008; 52(2): 175-82.
72. Schmalz G, Schweikl H, Hiller KA. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. *European journal of oral sciences.* 2000; 108(5): 442-8.
73. Siadat H, Alikhasi M, Mirfazaelian A, Geramipanah F, Zaery F. Patient satisfaction with implant-retained mandibular overdentures: a retrospective study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2008; 10(2): 93-8.

74. Slaughter A, Katz RV, Grasso JE. Professional attitudes toward denture adhesives: A Delphi technique survey of academic prosthodontists. *J Prosthet Dent.* 1999; 82(1): 80-9.
75. Soromou LW, Zhang Z, Li R, Chen N, Guo W, Huo M, et al. Regulation of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage by 7-O-methyl-naringenin. *Molecules.* 2012; 17(3): 3574-85.
76. Spenciere M, Zavanelli A, Carvalho Junior H, Zavanelli R. Impacto do uso de fita adesiva no grau de satisfação de pacientes institucionalizados e usuários de próteses totais convencionais. *Rev Odontol UNESP.* 2009; 38(6): 335-40.
77. Stafford GD, Russell C. Efficiency of denture adhesives and their possible influence on oral microorganisms. *J Dent Res.* 1971; 50(4): 832-6.
78. Sumita YI, Otomaru T, Taniguchi H. Effects of a denture adhesive in edentulous patients after maxillectomy. *Gerodontology.* 2012; 29(2): e645-9.
79. Tanaka MH, Univ Estadual Paulista A, Brasil, Alécio AC, Paulista UE, Flumignan DL, Paulista UE, et al. Inorganic elemental analysis and identification of residual monomers released from different glass ionomer cements in cell culture medium. *Rev Odontol UNESP.* 2013; 42(4): 273-82.
80. Tezvergil-Mutluay A, Carvalho RM, Pashley DH. Hyperzincemia from ingestion of denture adhesives. *J Prosthet Dent.* 2010; 103(6): 380-3.
81. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(8): 672-80.
82. Uysal H, Altay OT, Alparslan N, Bilge A. Comparison of four different denture cushion adhesives--a subjective study. *J Oral Rehabil.* 1998; 25(3): 209-13.
83. Vipond MN, Whawell SA, Scott-Coombes DM, Thompson JN, Dudley HA. Experimental adhesion prophylaxis with recombinant tissue plasminogen activator. *Annals of the Royal College of Surgeons of England.* 1994; 76(6): 412-5.
84. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 1998; 43(1): 45-50.
85. Zaki HS, Ketzan KJ, Carrau RL. Hypersensitivity of temporary soft denture liners: a clinical report. *J Prosthet Dent.* 1995; 73(1): 1-3.
86. Zavanelli RA, Magalhães JB, Guilherme AS, Melo LGNd, Cardoso LdC, Zavanelli AC. Impacto do uso de fita adesiva na qualidade de vida de pacientes institucionalizados e usuários de próteses totais convencionais. *Rev Odontol UNESP.* 2010; 39(5): 291-7.
87. Zhao K, Cheng XR, Chao YL, Li ZA, Han GL. Laboratory evaluation of a new denture adhesive. *Dent Mater.* 2004; 20(5): 419-24.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 31/01/2019  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 31 de janeiro de 2017.

ANDRESSA ROSA PERIN LEITE