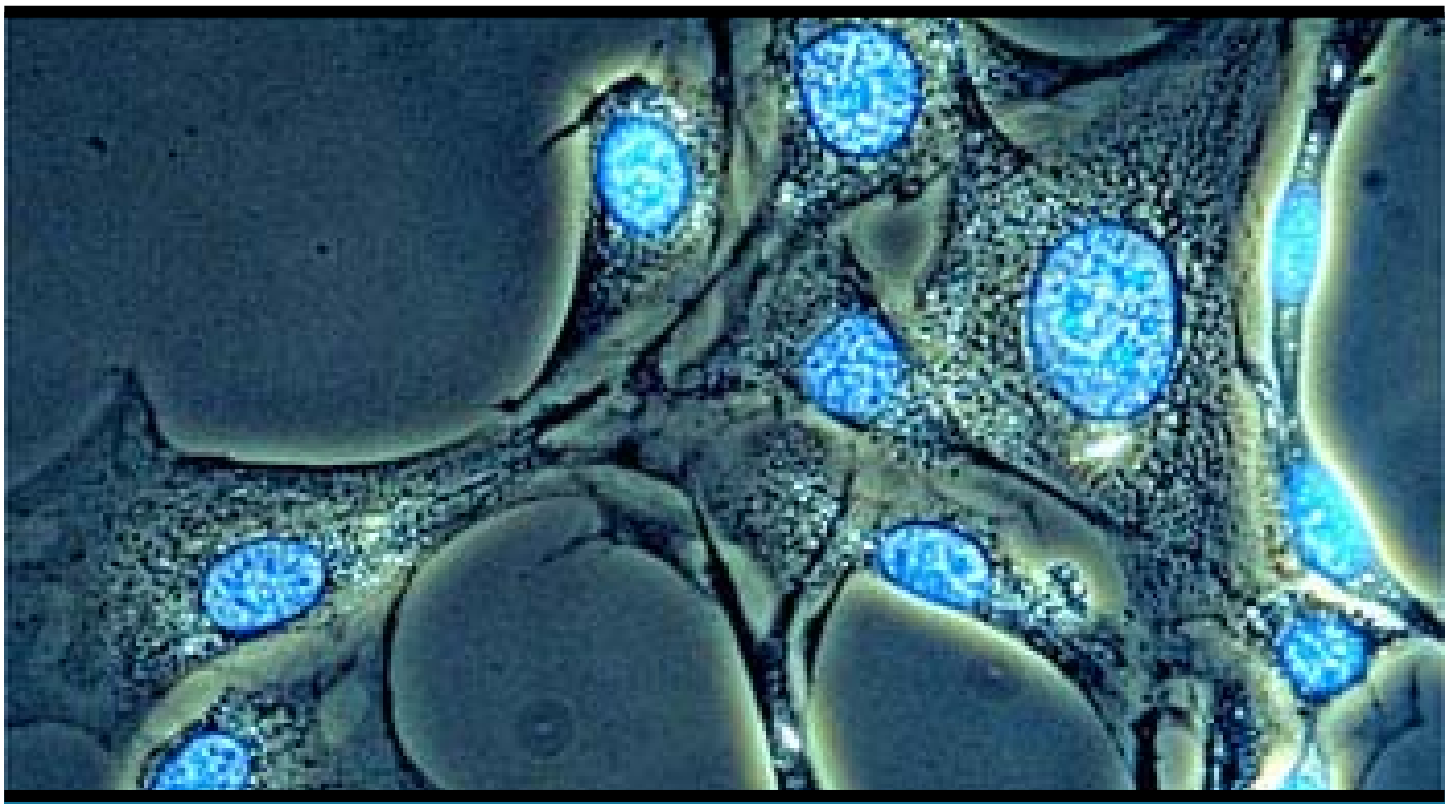
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Faculdade de Odontologia de Araraquara

JANAINA HABIB JORGE

Efeito do tratamento térmico em microondas e do tempo de armazenamento em água sobre a citotoxicidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses.



ARARAQUARA

2006

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Faculdade de Odontologia de Araraquara

JANAINA HABIB JORGE

Efeito do tratamento térmico em microondas e do tempo de armazenamento em água sobre a citotoxicidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral – Área de Prótese

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

ARARAQUARA

2006

Jorge, Janaina Habib
Efeito do tratamento térmico em microondas e do tempo de armazenamento em água sobre a citotoxicidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses / Janaina Habib Jorge. – Araraquara: [s.n.], 2005
185 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.
Orientadora: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo
Co-orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

1. Citotoxicidade imunológica 2. Resinas acrílicas 3. Tratamento térmico 4. Microondas I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley Cristina Chiusoli Montagnoli CRB 8/5646
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

Data da defesa: 15/02/2006

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

Professor Adjunto do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Professor Assistente Doutor do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

Professor Adjunto do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro

Professor Titular do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Prof. Dr. Wellington Cardoso Bonachela

Professor Associado do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

DADOS CURRICULARES

Janaina Habib Jorge

Nascimento: 18 de setembro de 1975

Filiação: Pai: Celso Habib Jorge

Mãe: Neusa Maiola Jorge

1996-1999: Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2000: Estágio de Atualização na Disciplina de Prótese Parcial Removível

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2001: Estágio Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2002: Estágio Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível

Dados Curriculares

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2003: Estágio Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2004: Estágio Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2001-2003: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Prótese – nível mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2003-2006: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral Área de Prótese – nível doutorado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

A Deus

Pela oportunidade de existir, viver, desafiar, conquistar e cumprir minha missão... Por iluminar toda a minha trajetória... Com toda certeza, sempre presente em minha vida... Pela inesgotável fonte de luz, energia e amor...



A Nossa Senhora,

Por sempre interceder por mim....

Minha gratidão e reconhecimento em forma de prece

À minha mãezinha querida

Neusa (in memorian)



Por tudo o que sou e que tenho, por tanta de tanto amor... Acredito que esteja me olhando de algum lugar e que, de alguma forma, me ajudou mais uma vez na conquista desse trabalho...

Mãe

Uma imagem inesquecível, um carinho insubstituível,

Um amor eterno!

Mãezinha linda... Pra sempre vou te amar...

Dedico esta conquista especialmente para você...

Aos meus queridos pais

Celso e Neusa (in memorian)

Que sempre me cercaram, mesmo com tantas dificuldades, de todas as condições para que eu pudesse chegar até aqui, dando-me mais que incentivo e amor, mas a vida como exemplo de perseverança e determinação...

Exemplos de dignidade e humildade, sempre presentes durante os momentos mais decisivos da minha vida...

Ter vocês como meus pais é viver a alegria
de quem sabe que recebeu um presente da vida.
Dedico esta conquista com muito amor e gratidão

À minha irmã Carolina

Por estar sempre presente, pela sabedoria e maturidade, a qual tento seguir...

Pelo amor, apoio e compreensão que me fizeram chegar até aqui...

Por se privar de tantas coisas para que eu pudesse realizar mais essa grande conquista.

Dedico este trabalho

com muito carinho e amor





Ao meu amor

João Henrique

Agradeço pelo amor, paciência e compreensão...

Mas principalmente agradeço por existir em minha vida!!!

“Quando Deus junta duas almas o objetivo é haver uma mudança... Ele irá transformar os dois, irá moldá-los para que juntos, sejam um só, e juntos possam cumprir um plano, atingir uma meta. Plano esse, que só um não conseguiria executar... mas é perfeito para dois!”

Joni, obrigada por tudo

Ao meu enteado Pedro Henrique

Obrigada por ter tornado a minha família mais completa...



À minha orientadora querida

Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

Agradeço a sua existência em minha vida...

Sem ela, com certeza as minhas dificuldades seriam maiores...

Agradeço aos conselhos como orientadora, mas, sobretudo, aos conselhos como mãe...

Agradeço por ter me ajudado a crescer...

Os meus agradecimentos especiais por tudo que a senhora fez e continua fazendo por mim...



Aos Professores Doutores Ana Cláudia Pavarina, Ana Lúcia Machado e Carlos Eduardo Vergani

Por iluminar a minha trajetória com seus exemplos de garra, sabedoria de vida e conhecimentos científicos.
Pelo incentivo, conhecimentos e disponibilidade em me ajudar.
Pela competência, seriedade, amor ao ensino e, principalmente, por grandes amigos que eu tive a oportunidade de conhecer.

À Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Pelos ensinamentos, paciência, oportunidade e orientação para desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

A todos os meus familiares

Pelo amor, apoio, incentivo e presença amiga durante toda a minha formação.

A todos os amigos do curso de pós-graduação

Pela amizade, união, compreensão e pela ajuda nos momentos de necessidade.

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral

Por todo apoio, tornando possível a realização desse trabalho.

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, em especial à Profa. Cínara e ao Prof. Marco

Pelos conhecimentos, apoio e amizade a mim dedicado.

Ao Prof. Dr. Romeu Magnani

Meu muito obrigado pela ajuda na análise estatística.

Ao CNPq

Pela bolsa de estudo concedida durante o curso de Doutorado em Reabilitação Oral

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese

Pela paciência, ajuda e amizade.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação

Pela amizade e atenção que me devotaram.

Aos funcionários da biblioteca, em especial à Ceres Maria C.G. de Freitas

Pela atenção, educação e ajuda.

Os meus agradecimentos

Sumário

1 Introdução _____20

2 Revisão da literatura _____29

2.1 Liberação de monômero residual _____29

2.2 Avaliação da citotoxicidade _____65

3 Proposição _____111

4 Material e método _____113

4.1 Materiais _____113

4.2 Métodos _____119

5 Resultado _____136

6 Discussão _____143

7 Conclusão _____157

8 Referências _____159

9 Apêndice _____174

Resumo _____178

Abstract _____182

1 Introdução

Desde a década de 30[17], as resinas acrílicas têm sido o material de escolha para a confecção de bases de próteses removíveis parciais ou totais em virtude de suas características de cor e translucidez, que permitem a imitação da aparência natural da gengiva, sendo esta a principal vantagem sobre o material antecessor, a borracha vulcanizada[70,84]. Esses materiais, na sua maioria, são compostos pela mistura de um polímero contendo peróxido de benzoíla e um monômero, geralmente o metacrilato de metila. A reação de polimerização do material ocorre pela decomposição rápida do peróxido após ter sido ativado, o que libera uma quantidade significativa de radicais livres, polimerizando o monômero e toda a mistura polimérica[3,9,17,18,50]. O peróxido de benzoíla pode ser ativado por substâncias químicas, geralmente incorporadas ao monômero, pela luz ou pelo calor, por meio de microondas, banho de água quente ou calor seco em estufa. Entretanto, a conversão de monômero em polímero não é completa, e o monômero que não sofreu reação é denominado monômero residual[35,39,79]. O monômero residual em contato com a mucosa pode atuar como irritante ou causador de reações alérgicas. Os sinais e sintomas clínicos mais freqüentes são vermelhidão, erosão na mucosa bucal, queimação na mucosa e na língua[2,21,69].

Histologicamente, pode-se observar infiltrado inflamatório e aumento da camada de queratina nas áreas da mucosa em contato com a prótese[34].

O aparecimento de reações adversas na mucosa bucal pelo uso de próteses tem despertado o interesse dos pesquisadores em determinar o comportamento biológico desses materiais objetivando buscar materiais biocompatíveis com o meio bucal. A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material de exercer suas funções específicas quando aplicado em tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem, contudo, causar danos ou prejuízo ao mesmo[16]. Assim, as resinas acrílicas para bases de próteses podem ser citadas como exemplo, devendo permanecer na cavidade bucal do paciente, em íntimo contato com a mucosa, sem causar irritação durante a utilização das próteses.

As resinas para a confecção de bases têm apresentado diferentes graus de citotoxicidade in vitro e de respostas alérgicas in vivo, provavelmente em função de componentes que não reagiram durante o processo de polimerização ou pela reação de seus subprodutos. Estudos têm demonstrado que as substâncias potencialmente tóxicas originadas de resinas de base incluem metil metacrilato, formaldeído, ácido metacrílico e ácido benzóico[43,49,62].

Tsuchiya et al.[76] verificaram que o formaldeído apresentou efeito citotóxico em concentrações menores do que o metil metacrilato. Esses componentes tóxicos, difundidos em meio aquoso, podem ser

capazes de agir inclusive em locais distantes da área de contato da resina. Dessa forma, áreas extensas de mucosa podem ficar expostas a componentes tóxicos por longo período de tempo[46].

As variações na composição química e na pureza dos sistemas de resinas comerciais, o grau de conversão de seus monômeros e as variáveis de manipulação podem influenciar nas suas propriedades biológicas e físicas[30,42]. A concentração de monômero residual varia com as condições utilizadas para sua polimerização[52,75,81]. Dessa forma, alguns aspectos técnicos são relevantes e podem auxiliar na redução do monômero residual, como o ciclo de polimerização utilizado, as condições e o tempo de armazenagem e o método de polimerização. Além disso, para evitar reações adversas, bem como para a diminuição da quantidade de monômero residual, vários autores têm sugerido a imersão da prótese em água antes da colocação no paciente[19,46,67].

Weaver e Goebel[81] verificaram que a imersão da prótese em água aquecida diminui a reação de hipersensibilidade dos pacientes. A redução da quantidade de monômero residual após esse tratamento ocorre em função da polimerização adicional na presença de radicais livres. Por meio da imersão em água aquecida, as moléculas de monômero residual difundem-se mais rapidamente, atingindo os radicais livres remanescentes, proporcionando uma reação complementar de polimerização. Da mesma forma, Tsuchiya et al.[76] sugeriram a imersão das próteses em água aquecida a 50^{o}C por 60 minutos com o objetivo de

reduzir a quantidade de monômero liberado e, conseqüentemente, o potencial citotóxico de resinas para base de prótese, particularmente as do tipo autopolimerizáveis.

A utilização de energia de microondas tem sido proposta como outro tipo de tratamento que poderia desencadear a reação complementar de polimerização. Yunus et al.[85] e Mello[53] verificaram que amostras submetidas à polimerização complementar por meio de energia de microondas tiveram reduzido conteúdo de monômero residual em comparação às amostras que não receberam esse tipo de tratamento.

A reabilitação de pacientes parcialmente desdentados com próteses removíveis parciais ou totais tem como objetivo a preservação dos dentes remanescentes e do rebordo residual, bem como o restabelecimento da função mastigatória e da estética. Entretanto, a reabsorção do osso alveolar é um processo crônico e irreversível que, se não for adequadamente controlada, poderá causar desajustes das bases acrílicas das próteses gerando desconforto para o paciente e incidência de forças horizontais nocivas sobre os dentes pilares, nos casos de extremidades livres. Além disso, o desajuste das bases das próteses pode favorecer a concentração de forças em determinadas regiões do rebordo, acelerando o processo de reabsorção óssea.

Tendo em vista esses efeitos deletérios, a adaptação das bases das próteses deve ser periodicamente reavaliada e, se for verificado desajuste, essas próteses deverão ser readaptadas aos tecidos

subjacentes. Dessa forma, os pacientes devem retornar ao consultório periodicamente para reavaliação do tratamento e reembasamento das próteses removíveis totais ou parciais. Uma das técnicas de reembasamento dessas próteses é realizada no próprio consultório, utilizando-se resinas acrílicas autopolimerizáveis especialmente formuladas para essa finalidade, os reembasadores diretos. Esse método, denominado reembasamento imediato, elimina as fases de inclusão e prensagem necessárias à realização do reembasamento do tipo mediato, sendo, por esse motivo, mais fácil, rápido e de custo acessível.

Uma vez que os materiais reembasadores estão em contato direto com a fibromucosa que reveste o rebordo residual, suas propriedades mecânicas, físicas e biológicas deveriam ser similares ou superiores às das resinas termopolimerizáveis empregadas na confecção de bases de próteses. Por esse motivo, estudos têm sido conduzidos para avaliar as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade desses materiais[1,4,6,8,12,19,33,42,43,44,45,46,47,64].

As substâncias tóxicas e seus efeitos sobre os tecidos têm sido constatados por meio de estudo em animais, observações clínicas e culturas de células in vitro[66]. O teste da citotoxicidade utilizando-se o método da cultura de células é considerado relativamente simples, reproduzível, efetivo e controlado[24,25]. Além disso, os estudos in vitro têm a vantagem de permitir fácil controle dos fatores experimentais, o que fornece confiabilidade aos experimentos[38]. Hensten-Pettersen[24], ao

comparar vários métodos indicados para avaliação de citotoxicidade, observou que os diferentes parâmetros utilizados incluem inibição do crescimento celular, citólise, alterações na membrana ou no citoplasma das células e alterações na atividade metabólica.

Não somente o método de citotoxicidade é importante, mas também o tipo de célula a ser cultivada. A escolha vai depender da natureza das observações a serem realizadas. As células cultivadas in vitro podem ser haplóides ou diplóides. Culturas primárias diplóides de fibroblastos podem ser obtidas de uma variedade de tecidos, tais como polpa dental, ligamento periodontal, pele, pulmão, etc. Essas culturas tendem a se multiplicar lentamente e têm um tempo de vida finito. Células haplóides, por sua vez, têm crescimento infinito, são fáceis de cultivar, e a qualidade de sua cultura é mais previsível. Algumas células haplóides comumente cultivadas e encontradas comercialmente com facilidade são os fibroblastos de hamster L929, os fibroblastos de hamster BHK 21, as células epiteliais de carcinoma cervical humano HeLa e as células epiteliais de pele humana NTCC 2544.

Embora se possa assumir que células haplóides e diplóides comportam-se diferentemente na avaliação in vitro da toxicidade, não há evidências de que isso ocorra[22]. Também não há evidências de que células epiteliais comportem-se diferentemente dos fibroblastos[14]. Se o objetivo único do experimento for avaliar a toxicidade relativa de um material em relação a outro, pouco se ganha em complicar

o sistema de análise com células primárias diplóides, muitas vezes difíceis de serem cultivadas. Além disso, o uso de células primárias dificulta a comparação entre os resultados de diferentes laboratórios[71]. Tais comparações são facilmente executadas quando se usam linhagens de células disponíveis comercialmente. Dessa forma, processos celulares gerais, tais como síntese de DNA, permeabilidade de membrana e determinação de citotoxicidade, não requerem células específicas[22]. Devido à sua alta capacidade de clonagem, as células L929 têm sido utilizadas para avaliação de citotoxicidade em diversos estudos[13,14,50].

Alguns testes têm sido realizados para determinar a citotoxicidade dos materiais, como o da incorporação de produtos radioativos, que avalia a síntese de DNA[27,73,77,78,80]. Com eles, pode-se observar, pelo método de cultura de células, a proliferação ou a inibição do crescimento celular decorrente do contato com substâncias citotóxicas.

De acordo com os estudos anteriormente citados,[8,29,31,32,33,42,43,44,45,46,47] resinas acrílicas termopolimerizáveis, autopolimerizáveis, condicionadores de tecido, materiais fotopolimerizáveis e resinas ortodônticas apresentam efeitos citotóxicos em virtude de seus componentes hidrossolúveis, como os monômeros residuais, aditivos, produtos e subprodutos das suas reações de polimerização.

Jorge et al.[33] e Campanha et al.[12] realizaram estudos utilizando o teste de incorporação de ^{3}H-timidina e o teste MTT para

avaliar a citotoxicidade de resinas acrílicas para bases e reembasamento de próteses, respectivamente. Os resultados mostraram que as substâncias liberadas pelas resinas testadas foram mais citotóxicas para as células L 929 quando comparadas ao controle negativo no teste de incorporação de ^{3}H-timidina. O teste de incorporação ^{3}H-timidina classificou os materiais como discretamente citotóxicos, e o MTT, como não citotóxicos, sendo, portanto, considerado menos sensível.

É importante ressaltar que os mesmos autores acima citados[12, 33] observaram, também, o efeito dos tratamentos térmicos em microondas com as amostras mantidas a seco durante as exposições e em banho de água sobre a citotoxicidade de algumas resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses. Seus resultados mostraram que, para a maioria das resinas, esses tratamentos não influenciaram a citotoxicidade dessas resinas. Assim, com base nessas informações, foi julgado oportuno avaliar no presente estudo o efeito do tratamento térmico em microondas com as amostras imersas em água sobre a citotoxicidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses. Este tratamento teve como objetivo verificar se a associação entre a difusão dos seus componentes em água e a polimerização complementar obtida pelas microondas e pela água aquecida seria eficaz na diminuição da citotoxicidade.

2 Revisão da Literatura

Com o objetivo de facilitar a compreensão, o capítulo “Revisão da Literatura” apresentará os trabalhos revistos divididos em tópicos: aqueles relacionados com a liberação de monômero residual e aqueles referentes à avaliação da citotoxicidade.

2.1 Liberação de monômero residual

O primeiro pesquisador a estudar a energia de microondas na polimerização de resinas acrílicas foi Nishii[57], em 1968. Neste estudo, o autor avaliou a porosidade, sorção de água, dureza, resistência à tração, resistência à flexão, deflexão transversal, resistência de união de dentes artificiais e adaptação das próteses polimerizadas por meio de microondas. Segundo ele, tanto as regiões superficiais da massa polimérica quanto as profundas são aquecidas rápida e uniformemente, diminuindo o tempo, aumentando o grau de polimerização e prevenindo a porosidade. Os ciclos utilizados para a polimerização em forno de microondas de amostras de uma resina convencionalmente termopolimerizável foram de 9, 10, 11 e 12

minutos. O autor obteve resultados satisfatórios, quanto a porosidade, quando foram utilizadas muflas perfuradas com redução da energia de alta freqüência. As propriedades físicas das resinas polimerizadas por 11 minutos de irradiação foram tão satisfatórias quanto às das resinas polimerizadas pela técnica convencional em banho de água quente.

McCabe e Basker[52], em 1976, descreveram a técnica de cromatografia a gás para avaliar o nível de monômero residual de resinas para bases de próteses ativadas termicamente. Foram avaliadas dois tipos de resina (Stellon e De Trey Self Cure) e próteses de resina acrílica termopolimerizável pertencentes a um paciente que apresentava a sintomatologia de ardência da mucosa após a colocação de próteses confeccionadas recentemente. Corpos-de-prova com 50 x 50 x 3 mm foram confeccionados, de ambas as resinas, com diferentes ciclos de polimerização. Após a confecção, os corpos-de-prova ficaram armazenados em água por 24 horas. A análise por meio da cromatografia a gás mostrou níveis elevados de monômero residual nas próteses do paciente o que, juntamente com os achados clínicos, confirmou o diagnóstico de sensibilização tecidual à resina acrílica. Foram confeccionadas duas próteses novas tendo sido uma foi entregue ao paciente e a outra foi submetida ao teste de cromatografia a gás. A reação tecidual desapareceu após a

confecção de próteses com baixos níveis de monômero residual. Os resultados mostraram que os níveis mais baixos de monômero residual foram encontrados nos ciclos longos (7 horas a 70^0C, seguido por 3 horas a 100^0C). Foram encontrados níveis intermediários de monômero no ciclo longo a seco (7 horas a 70^0C, seguido por 3 horas a 100^0C) e rápido em água (20 minutos). Os autores concluíram que próteses confeccionadas com resina termopolimerizável devem ser corretamente processadas para se obter uma polimerização completa e, conseqüentemente, maior conversão de monômero em polímero e que a técnica da cromatografia a gás é um exame auxiliar confiável para se determinar o conteúdo de monômero residual das próteses em utilização pelos pacientes.

O efeito do ciclo de polimerização sobre algumas propriedades do polimetil metacrilato foi verificado por Jagger[29], em 1978. Para a análise da quantidade de monômero residual, foram confeccionados corpos-de-prova medindo aproximadamente 60 x 24 x 8 mm com resina Kallodent 333, tendo sido utilizados os seguintes ciclos de polimerização: 1) 7 horas a 70ºC, 2) 14 horas a 70ºC, 3) 1 hora a 100ºC e 4) 7 horas a 70ºC seguidas de 1 hora a 100ºC. Após a demuflagem, as amostras foram cortadas em pequenas tiras para que se procedesse a análise da quantidade de monômero residual por meio da cromatografia a gás. Os resultados mostraram uma concentração de 2,08% de monômero residual para o ciclo

de 7 horas a 70ºC, tendo sido encontrada a concentração de 1,59% para o ciclo de 14 horas sob a mesma temperatura, indicando redução do monômero residual com o aumento do tempo de polimerização. Para os ciclos de 1 hora a 100ºC e 7 horas a 70ºC seguidas por 1 hora a 100ºC, observou-se uma quantidade de monômero residual de 0,68 e 0,69 respectivamente, indicando que o grau de conversão aumenta com a elevação da temperatura de 70 para 100ºC. Levando-se em consideração as outras propriedades verificadas, como resistência a tensão e dureza, o autor recomendou a utilização do ciclo de 7 horas a 70ºC associado a 1 hora a 100ºC para a polimerização das resinas acrílicas a base de polimetil metacrilato devido ao aumento do grau de conversão de monômero em polímero.

Austin e Basker[5], em 1980, realizaram um estudo com o objetivo de analisar o conteúdo de monômero residual de algumas resinas acrílicas por meio da utilização da cromatografia líquida. Segundo os autores, as resinas para bases de próteses polimerizadas por meio de ciclos curtos (menos do que 2 horas) promovem cerca de sete vezes mais concentração de monômero residual do que aquelas polimerizadas por ciclos longos (mais do que 6 horas). Os autores observaram ainda que o monômero presente nas resinas termopolimerizáveis pode ser mais resistente à remoção por difusão em água.

Ruyter[62], em 1980, realizou um estudo com o objetivo de avaliar a liberação e a origem do formaldeído de resinas acrílicas para bases de próteses. Segundo o autor, o formaldeído é um dos responsáveis por causar injúrias na mucosa oral dos pacientes portadores de próteses. Para o estudo, foram confeccionados corpos-de-prova com 50 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura com resinas termopolimerizáveis (Paladon 65, Swe Base e SR 3/60), resinas autopolimerizáveis do tipo pó (Palacast, Swe Flow e Ivocast) e autopolimerizáveis tipo massa (Palapress, Swebond Compact e Quick 20), de acordo com as instruções dos fabricantes. Os corpos-de-prova foram, então, tratados para que o formaldeído fosse liberado em solução. As soluções contendo formaldeído foram analisadas por meio da cromatografia líquida de alta performance. Também foi verificada a composição de monômeros líquidos de cada resina, a quantidade de oxigênio dissolvido em cada monômero e a formação de formaldeído por meio da reação entre o oxigênio e o monômero. Os resultados mostraram que a quantidade de formaldeído liberada pelas resinas termopolimerizáveis foi menor do que a quantidade liberada pelas resinas autopolimerizáveis. Em relação à composição, as resinas autopolimerizáveis apresentaram diferentes tipos de monômeros líquidos com respectivos agentes de ligações cruzadas. Os resultados mostraram, ainda, que, após 4 semanas a 37ºC, a reação entre metil metacrilato e oxigênio formou uma mistura contendo monômero metil metacrilato, metil piruvato, formaldeído e copolímero oxigênio-metil

metacrilato, confirmando os resultados de estudos prévios que mostram que o formaldeído é decorrente da reação entre o oxigênio e o monômero residual.

Sabendo-se que o monômero residual é o principal causador de danos na mucosa de pacientes portadores de próteses, Lamb et al.[40], em 1982, realizaram um estudo com a proposta de avaliar a quantidade de monômero residual em resinas autopolimerizáveis. Assim, corpos-de-prova foram confeccionados com temperaturas de polimerização de 22ºC e 55ºC por períodos de 5 a 30 minutos. Para a análise da quantidade de monômero residual, as amostras foram armazenadas em água destilada por diferentes tempos, tendo sido as soluções analisadas em espectrofotômetro. Os resultados mostraram que a concentração de monômero residual foi reduzida por dois processos: 1) difusão do monômero em água e 2) polimerização adicional do monômero dentro da massa de resina. Os resultados mostraram, ainda, que o monômero residual pode ser minimizado se as resinas autopolimerizáveis forem polimerizadas em temperaturas acima de 55ºC e que a difusão completa do monômero em água foi conseguida quando as amostras foram armazenadas por 14 dias a 22ºC ou por 7 dias a 37ºC, mostrando a importância do armazenamento das próteses em água, preferencialmente aquecida, anteriormente à colocação nos pacientes.

Lamb et al.[39], em 1983, avaliaram o efeito da proporção pó/líquido, das variações na temperatura de polimerização e armazenagem e eliminação da camada de oxigênio sobre os níveis de monômero residual de uma resina acrílica autopolimerizável (Simplex Rapid). Segundo os autores, as resinas acrílicas são, na maioria das vezes, formadas pela mistura de um polímero, contendo peróxido de benzoíla, com um monômero contendo um catalisador, como por exemplo, uma amina terciária. Após a mistura, o peróxido se decompõe rapidamente sendo que, mesmo em temperatura ambiente, ocorre a formação de uma quantidade significativa de radicais livres que promoverão a polimerização do monômero. Em relação à proporção pó/líquido, os resultados mostraram que as resinas preparadas com uma proporção alta de 5:3 apresentaram dosagens significativamente menores de monômero residual quando comparadas àquelas preparadas com uma proporção baixa de 4:3. Analisando-se a quantidade de monômero residual logo após a polimerização, observou-se que o nível de monômero foi maior para as amostras polimerizadas a 22ºC quando comparadas ao daquelas polimerizadas a 55ºC. Após 3 dias de armazenagem, os níveis de monômero residual foram reduzidos e houve uma inversão de valores devido a uma maior velocidade de perda de monômero das amostras polimerizadas a 22ºC. Dessa forma, após esse período, as amostras polimerizadas a 55ºC apresentaram os maiores valores de monômero residual. Pôde-se observar também, que os corpos-de-prova que foram mantidos em contato com o ar

atmosférico apresentaram níveis inferiores de monômero residual comparados àqueles mantidos em ausência de ar. Os autores concluíram que os radicais livres presentes na resina autopolimerizável, após a polimerização inicial, são os principais responsáveis pela redução da concentração de monômero residual ao longo do tempo.

Jerolimov et al.[30], em 1985, realizaram um estudo com o objetivo de verificar o nível de monômero residual em função de alterações na proporção polímero/monômero de resinas acrílicas termopolimerizáveis. Para tal, foram confeccionados 40 corpos-de-prova, os quais foram divididos em 10 grupos, onde variou-se a proporção pó/líquido e o ciclo de polimerização. Os ciclos utilizados foram: 14 horas a 70ºC e 7 horas a 70ºC seguidas por 3 horas a 100ºC. As proporções pó/líquido foram de: 1,5/1, 2/1, 2,5/1,3,5/1 e 4,5/1. O monômero residual foi extraído pelo refluxo em metanol e analisado por meio da cromatografia a gás. Segundo os autores, o ciclo que utilizou o tempo adicional de 3 horas a 100ºC produziu os menores níveis de monômero residual e para o ciclo que não utilizou tal tempo adicional, a medida que a proporção pó/líquido foi aumentada, a quantidade de monômero residual foi reduzida significativamente. Além disso, os autores verificaram que o ciclo de polimerização empregado tem maior influência na redução dos níveis de monômero do que a proporção polímero/monômero.

Com o objetivo de investigar o nível de monômero residual em função do tempo de 6 diferentes marcas de resinas utilizadas na confecção de aparelhos ortodônticos, Stanfford e Brooks[72], em 1985, realizaram um estudo analisando o nível de monômero residual da massa de resina por meio da cromatografia a gás e o monômero difundido na água através do uso da espectroscopia ultravioleta. Os autores concluíram que o mais alto nível de monômero residual existe em resinas autopolimerizáveis e que, em resinas termopolimerizáveis, o nível de monômero diminui com o tempo devido à polimerização contínua e difusão do mesmo para a água. Além disso, os autores relataram que se os aparelhos ortodônticos fossem mantidos na água antes de serem colocados na boca do paciente, grande parte do monômero da superfície seria liberada e o monômero remanescente influenciaria apenas nas propriedades mecânicas das resinas.

De Clerck[19], em 1987, considerou que a polimerização da resina mais comumente utilizada na confecção de próteses dentárias, o polimetacrilato de metila, requer a ativação de um iniciador (peróxido de benzoíla), o qual forma os primeiros radicais livres que iniciam a polimerização em cadeia, em temperaturas acima de 60ºC. Resinas polimerizadas em temperaturas próximas à da ebulição do monômero (100,8ºC) apresentam altos níveis de porosidade, sendo que tal temperatura é facilmente atingida quando o calor interno gerado pela reação exotérmica

da resina não é eliminado eficazmente. Para evitar porosidade, podemos utilizar ciclos com temperaturas mais baixas com períodos longos, evitando que o meio externo fique mais quente que no interior da mufla, possibilitando assim, a eliminação do calor. Porém, se o calor necessário à quebra do peróxido de benzoíla em radicais livres (60ºC) pudesse ser gerado dentro da própria resina, a temperatura no exterior da mufla poderia se manter baixa. Dessa forma, o calor da reação de polimerização poderia ser eliminado com maior eficiência, minimizando-se os riscos de porosidade na resina acrílica. As microondas são ondas eletromagnéticas que podem ser utilizadas para gerar calor no interior das resinas acrílicas. Realizando testes simples, o autor observou que 3 minutos e 30 segundos são suficientes para que ocorra ebulição de 30 cc de monômero. Notou também que o polímero e o monômero misturados, em porções de 3 mg, prensados na fase plástica, iniciaram a polimerização em 4 minutos em microondas estando completamente polimerizados em 8 minutos. Além disso, observou que a quantidade de monômero residual é menor com a polimerização pelo microondas quando comparada com o método convencional. Isso ocorre porque as microondas geram movimentos de alta freqüência das moléculas de monômero, causando um aumento do calor interno e, conseqüentemente, maior conversão de monômero em polímero. Portanto, o menor tempo e a menor quantidade de monômero residual são algumas das vantagens da polimerização por meio de microondas.

Oysaed et al.[60], em 1988, realizaram um estudo com o objetivo de verificar a liberação de formaldeído de compósitos dentais de acordo com o tempo. Para o estudo, corpos-de-prova de 9 tipos de resinas compostas (Adaptic, Concise, P10, P30, Ful-fil, Occlusin, Estilux Posterior, Estilux e Nuva-Fil P.A.) foram confeccionados medindo 15 mm de diâmetro e 1,2 mm de espessura. Posteriormente, as substâncias potencialmente tóxicas foram extraídas e as soluções analisadas por meio da cromatografia líquida de alta performance. Os resultados mostraram uma alta quantidade de formaldeído liberada pelos corpos-de-prova das resinas compostas quimicamente ativadas (P10, Adaptic e Concise), quando presente a camada de inibição, e da resina fotoativada Estilux Posterior devido à oxidação do monômero metacrilato de metila. Além disso, observou-se que a liberação de formaldeído ocorre mesmo após 115 dias de imersão dos corpos-de-prova em água.

Truong e Thomasz[74], em 1988, compararam a polimerização por água aquecida e por meio de microondas de resinas acrílicas em relação à resistência transversa, dureza superficial, porosidade, sorção de água e liberação de monômero residual. Foram utilizadas quatro marcas de resinas acrílicas: Trevalon, QC 20, Vertex RS e Ivocryl. Corpos-de-prova de todas as resinas foram confeccionados a partir da mistura do pó com o líquido, de acordo com as instruções dos fabricantes e divididos em dois grupos: alguns

foram polimerizados em água aquecida e outros por meio de microondas para, posteriormente, serem submetidos aos diferentes ensaios. Para os ensaios de resistência transversa, dureza superficial e sorção de água, as amostras foram analisadas de acordo com "Australian Standard". Para a porosidade, as leituras foram feitas após polimento e observadas em microscópio com aumento de 10x. Para a determinação da quantidade de monômero residual, as amostras foram imersas em acetona ou clorofórmio e avaliadas por meio da cromatografia a gás. Como resultados, houve porosidade em todas as amostras, o que se deduz que seja causado pelo calor excedente da reação. Os valores de dureza superficial e resistência transversa não foram diferentes estatisticamente entre as resinas estudadas. As amostras polimerizadas pelo método convencional mostraram maior concentração de monômero residual em relação às polimerizadas por meio de microondas.

Para comparar as técnicas de polimerização com energia de microondas e banho de água quente, em relação à conversão de monômero, peso molecular e porosidade, Al Doori et al.[1], em 1988, realizaram um estudo utilizando quatro resinas acrílicas. O ciclo utilizado para a polimerização por meio de microondas foi de 24 minutos a 70 W de potência e o banho de água quente foi de 7 horas a 70ºC seguido de 3 horas a 100ºC, variando-se a espessura dos corpos-de-prova. As quantidades de monômero residual,

detectadas através da cromatografia a gás, revelaram que, apesar da conversão de monômero com a energia de microondas ter sido substancial, a quantidade mínima obtida com a polimerização convencional não foi atingida com o ciclo proposto para a polimerização em microondas. Os valores de peso molecular dos materiais polimerizados, utilizando-se ambos os métodos, foram praticamente os mesmos. Os problemas de porosidade relacionados com o rápido aquecimento da massa de resina puderam ser controlados com o ciclo de 24 minutos a 70 W, porém, em seções superiores a 3 mm de espessura, a porosidade não pôde ser evitada. Segundo os autores, a técnica de polimerização por meio de microondas pode, eficazmente, polimerizar resinas para bases de próteses entretanto, nas seções mais espessas, podem causar porosidades. Assim, com esse estudo, concluíram que a técnica de polimerização por meio de microondas não oferece vantagens em relação à técnica de aquecimento rápido em água.

Para que ocorra a polimerização de resinas acrílicas a base de polimetil metacrilato é necessária a ativação, pelo calor ou por substâncias químicas, do peróxido de benzoíla, o qual forma radicais livres, iniciando a conversão de monômero em polímero. Sendo assim, Shlosberg et al.[68], em 1989, realizaram um estudo com o objetivo de analisar algumas propriedades das resinas acrílicas polimerizadas por meio de microondas, como porosidade, dureza e conteúdo de monômero residual, em

comparação com o método convencional de polimerização em banho de água quente. Para tal, próteses totais foram confeccionadas, utilizando-se a resina Lucitone, sob dois tipos de polimerização: em banho de água quente, com muflas metálicas, por 8 horas a 74ºC seguido de 1 hora a 100ºC ou por energia de microondas, com muflas plásticas, por 13 minutos a 90 W na posição vertical seguido de 90 segundos a 500 W na posição horizontal. Para a verificação do conteúdo de monômero residual, quatro amostras de cada grupo foram reduzidas a pó para posterior análise em espectroscopia. Por essa análise, os autores não verificaram picos que indicassem a presença de monômero residual em ambos os métodos testados, concluindo que a energia de microondas pode ser utilizada para a polimerização de próteses a base de polimetil metacrilato com efetividade.

Com o objetivo de estabelecer um ciclo de polimerização ideal para diferentes resinas acrílicas, Harrison e Huggett[23], em 1992, realizaram um estudo utilizando vários tipos de resinas (AC RO, AC RO Mark 20, Acron Standard, Acron Rapid, Betacryl II, Croform Exten, De Trey QC 20, Doric, Fast-cure, LP 22, Meadway-super-cure, Meliodent, Metrocryl, Metrocryl LWT, Metrocryl Rapid Cure, Metocryl Universal, Minacryil Universal, Plastex, Rediolon Standard, Stellon 100, Trevalon, Trevalon C, Trevalon Hi, WHW) submetendo-as a diferentes ciclos de polimerização. Os corpos-de-prova de 65 x 40 x 5 mm, confeccionados utilizando-se a técnica convencional

termopolimerizável com uso de muflas, foram armazenados em água a 37ºC por 23 horas e, em seguida, expostos a temperatura de 23ºC no ar por 1 hora anteriormente aos testes realizados com o uso da cromatografia gás-líquida. Os ciclos avaliados foram: 1) 7 horas a 70ºC; 2) 14 horas a 70ºC; 3) 7 horas a 70ºC + 1 hora a 100ºC; 4) 14 horas a 70ºC + 1 hora a 100ºC; 5) colocação da mufla em água em ebulição, remoção do calor por 20 minutos e retorno da água em ebulição por mais 10 minutos; 6) colocação da mufla em água em ebulição, retorno da água em ebulição, mufla na água em ebulição por mais 10 minutos; 7) temperatura acima de 100ºC utilizando o sistema de calor a seco; 8) 7 horas a 60ºC; 9) 7 horas a 60ºC + 1 hora a 90ºC; 10) colocação da mufla em água em ebulição, remoção do calor por 20 minutos e retorno da temperatura da água a 90ºC por mais 5 minutos; 11) colocação da mufla em água em ebulição e retorno da temperatura da água a 90ºC por 5 minutos. Os resultados mostraram que o ciclo de 7 horas em água a 70ºC associado a um aquecimento terminal por 1 hora a 100ºC é ideal, resultando em máxima conversão do monômero residual. Além disso, o ciclo de 7 horas a 60ºC e o ciclo de colocação da mufla em água em ebulição, retornando a temperatura da água para 90ºC e mantendo-a por 5 minutos, mostraram alta concentração de monômero residual liberado, sendo assim contra-indicado para a polimerização de resinas acrílicas para base de próteses.

Sadamori et al.[63], em 1992, realizaram um estudo com a proposta de determinar o conteúdo de monômero residual liberado por próteses e sua estimativa de redução por longo período de uso. Para esse estudo, 24 próteses totais superiores foram utilizadas, das quais foram extraídas pequenas porções da região posterior (0,2 gm aproximadamente). As amostras foram colocadas em tubos contendo metil etil kertone e foram armazenadas por 96 horas a 4ºC. Em seguida, 25 μl de p-xylene foram adicionados aos tubos e levados para a centrifugação. O extrato foi pipetado e analisado com o uso da cromatografia gás-líquida. Os resultados mostraram que o conteúdo de monômero residual tende a ser menor em próteses utilizadas por longo período do que aquelas usadas por períodos curtos. Isso sugere que o monômero residual das resinas acrílicas para base de próteses diminui com o aumento do período de uso, sendo que a maior liberação ocorre nos primeiros 5 anos. Porém, ainda há liberação do monômero residual por muitos anos.

Com o objetivo de quantificar plastificantes presentes na saliva de indivíduos portadores de prótese dentária, Lygre et al.[51], em 1993, realizaram um estudo utilizando a cromatografia a gás e a espectrometria de massa associada à cromatografia a gás, identificando também, outros componentes orgânicos liberados. Para esse estudo, 4 homens e 7 mulheres

que utilizavam prótese, com média de idade de 67,8 anos, foram selecionados. A maioria desses pacientes fazia uso de prótese total inferior e superior, sendo que somente um paciente usava prótese parcial removível superior e um, utilizava apenas a prótese total superior. Os pacientes selecionados receberam novas próteses confeccionadas com resina termopolimerizável (Vertex 5RS) de acordo com as instruções do fabricante. Para identificar as substâncias liberadas na saliva pelas próteses, corpos-de-prova medindo 26 x 26 x 3 mm foram preparados sob as mesmas condições das próteses, colocados em recipientes de vidro contendo 80 ml de etanol, cobertos com folha fina de alumínio e levados para agitação por 20 horas a 37ºC. Em seguida, as amostras foram analisadas pela espectrometria de massa associada a cromatografia a gás, para identificação dos diferentes produtos liberados pela resina termopolimerizável. Como grupo controle, amostras de saliva de 11 indivíduos que não usavam prótese, com média de idade de 22,9 anos, foram coletadas. Amostras de saliva dos pacientes que utilizavam próteses foram coletadas com a prótese antiga e após uma semana de utilização das próteses novas. A análise das substâncias liberadas por todas as amostras foi feita através da cromatografia a gás e da técnica da espectrometria de massa associada à cromatografia a gás. Os resultados mostraram que fitalato de dibutil e benzoato de fenil foram encontrados na saliva dos pacientes com próteses novas, sendo que nenhuma dessas substâncias foram encontradas nas amostras de saliva do

grupo controle (que não utilizavam prótese). A concentração de fitalato de dibutil encontrada na saliva dos pacientes com prótese nova foi significativamente maior do que a encontrada nas amostras de saliva com a utilização de próteses antigas. O número de picos observado na cromatografia foi maior para as amostras com próteses novas e significativamente diferente do grupo controle, mas não significativamente diferente das amostras com prótese antigas. Este estudo demonstra que os aditivos dos polímeros para base de próteses são liberados na saliva dos indivíduos que utilizam próteses novas em condições clínicas normais.

Sendo o formaldeído um dos agentes responsáveis pelas injúrias na mucosa bucal, Tsuchiya et al.[75], em 1993, realizaram um estudo com o objetivo de quantificar, através da análise de injeção de fluxo, o formaldeído liberado pelas resinas acrílicas para bases de próteses polimerizadas por diferentes métodos. Assim, corpos-de-prova com 8,5 mm de diâmetro e 2 mm de altura foram confeccionados, de acordo com as instruções dos fabricantes, utilizando-se uma resina autopolimerizável (Rebaron nº 3), uma termopolimerizável (Acron nº 8) e uma polimerizada por meio de microondas (Acron MC nº 8). Os discos foram colocados em frascos de vidro com 2 ml de água destilada e imersos em água a 37ºC. Alíquotas de 50 a 70μl foram coletadas em diferentes intervalos de tempo e analisadas

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

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

Dogan et al.[20], em 1994, avaliaram algumas propriedades mecânicas e a absorção de água de duas resinas acrílicas termopolimerizáveis (QC 20 e Paladon 65), uma resina injetável (SR Ivocap) e duas resinas autopolimerizáveis (Meliodent e Palapress), em relação a diferentes tipos de processamento. Foram confeccionados corpos-de-prova nas dimensões de 6 x 3 x 0,5 cm, após proporção e manipulação das resinas de acordo com as instruções dos fabricantes. Os materiais termopolimerizáveis foram submetidos a ciclos de polimerização nos tempos de 30, 40 e 50 minutos em água a temperatura de 100ºC. Já os materiais autopolimerizáveis foram polimerizados a 20, 25 e 30ºC durante 30 minutos. Para determinar o nível de monômero residual, foram utilizadas amostras de aproximadamente 1 grama, cortadas em baixa rotação, e analisadas por meio da cromatografia gás-liquido. Os resultados mostraram que o conteúdo

de monômero residual foi significativamente menor para as amostras de resinas autopolimerizáveis polimerizadas em temperaturas mais altas e para as amostras de resinas termopolimerizáveis polimerizadas em ciclos longos, mostrando a influência de diferentes tipos de processamento nas propriedades desses materiais.

Com os objetivos de determinar as variações nas propriedades mecânicas e físicas e verificar se as resinas convencionais podem ser polimerizadas por meio de microondas, Ilbay et al.[26], em 1994, realizaram um estudo utilizando uma resina convencionalmente ativada pelo calor (Meliodent). Para o experimento, corpos-de-prova foram preparados com 20 mm de diâmetro e 1 mm de altura e nesses foram aplicados diferentes processos de polimerização, alterando-se a potência das microondas e o tempo de cura. O tempo de polimerização variou de 2 minutos com potência máxima de 550W a 10 minutos na potência mínima de 110W. A recomendação para o ciclo de polimerização é de 3 minutos a 550W de potência, onde não ocorrem variações relevantes nas propriedades das resinas. Os testes mecânicos e físicos desse estudo mostraram que as resinas acrílicas convencionais utilizadas para confecção de bases de próteses podem ser polimerizadas por meio de microondas.

Yunus et al.[85], em 1994, realizaram um estudo para avaliar o efeito do aquecimento em microondas no nível de monômero residual da resina acrílica autopolimerizável Meliodent utilizada para reparos de próteses. Para isso, foram utilizados três diferentes métodos de polimerização. Cinco corpos-de-prova foram obtidos sob pressão à temperatura de 20ºC, cinco foram submersos em água a 35ºC por 20 minutos e outros cinco foram polimerizados por meio de microondas a 50 W por 5 minutos. Depois disso, foram banhados em água a 37ºC. O conteúdo de monômero residual foi verificado nos intervalos de 20 minutos, 1 hora, 1 semana e 1 mês após a preparação dos corpos-de-prova por meio da cromatografia a gás. Os resultados mostraram que a polimerização por meio de microondas diminuiu a quantidade de monômero residual nos períodos de 20 minutos e 1 hora em relação aos outros métodos de polimerização.

Lygre et al.[50], em 1995, realizaram um estudo com o objetivo de separar, identificar e quantificar os componentes orgânicos liberados in vitro de alguns polimetacrilatos de metila para base de próteses. Dessa forma, corpos-de-prova de uma resina termopolimerizável (Vertex 5RS) e duas autopolimerizáveis (Palpress Vario e Swebond Compact) foram confeccionados de acordo com as instruções dos fabricantes com 50 mm de diâmetro e 0,5 mm de altura. A resina termopolimerizável foi submetida a dois tipos de processamento, um com temperatura de 100ºC por 65 minutos

e o outro com temperatura de 80ºC por 45 minutos, ambos sob compressão. A resina autopolimerizável Palpress Vario foi processada a uma temperatura de 55ºC por 15 minutos e a Swebond Compact a 40ºC por 10 minutos, ambas sob compressão de 0,2 MPa. Depois da confecção, os corpos-de-prova foram colocados em solução de Ringer (40,5 g de NaCl, 89 g de KCl, 1,125 g de CaCl2, água destilada, pH=6,0) por 7 dias ou em etanol por 20 horas para que ocorresse a liberação dos produtos. Vários testes foram utilizados para identificar e quantificar os produtos liberados pelas resinas, entre eles, a cromatografia a gás, a espectrometria de massa e a cromatografia líquida. Os resultados mostraram que várias substâncias são liberadas pelas resina, como os componentes orgânicos, aditivos e outras substâncias incorporadas durante a manipulação ou decorrentes da degradação de produtos. Nesse estudo foi observado que há uma relação inversa entre a temperatura de processamento e a quantidade de produtos liberados, ou seja, quanto maior a temperatura de processamento, menor a quantidade de produtos liberados. Os autores destacaram que as resinas a base de polimetacrilato de metila liberam substâncias como o monômero metacrilato de metila, ácido metacrílico, ácido benzóico, difenil benzoato e formaldeído. Porém, os componentes responsáveis pelo efeito citotóxico das resinas para base de próteses ainda não foram totalmente identificados.

Tendo em vista o número crescente de resinas autopolimerizáveis para reembasamento de próteses, Arima et al.[4], em 1996, analisaram algumas dessas resinas quanto à composição química, temperatura de transição vítrea, peso molecular e distribuição do tamanho das partículas do pó. Para a avaliação da composição do pó e do líquido, foi utilizado o método da espectrofotometria. Os resultados evidenciaram que o pó das resinas Tokuso Rebase, Kooliner e New Truliner é composto de polietil metacrilato. Os autores observaram relação direta entre a composição química do material e suas propriedades.

Craig[17], em 1997, relatou que o nível de monômero residual é reduzido a 6,6% após o processamento de uma resina por 1 hora a 70ºC. Após o mesmo período a 100ºC, o nível de monômero residual é diminuído para 0,31%, indicando, assim, que o acréscimo de 1 hora a 100ºC no ciclo de polimerização deve ser indicado. Contudo, a temperatura não pode chegar a fervura antes que a maior parte da polimerização tenha sido completada. O autor relatou, ainda, que o armazenamento de próteses por vários dias em temperaturas acima de 50ºC e sem o contato com o oxigênio reduz a quantidade de monômero residual. Havendo evidências de que o metil metacrilato possui pobre biocompatibilidade, todo método que visa eliminar ou reduzir o monômero deve ser realizado.

De acordo com Anusavice[3], em 1998, o aquecimento das resinas termopolimerizáveis em temperaturas acima de 60ºC faz com que as moléculas de peróxido de benzoíla entrem em decomposição formando os radicais livres. Em seguida, cada radical reage com uma molécula de monômero disponível, iniciando o crescimento da cadeia polimérica, ou seja, iniciando o processo de polimerização. Nesse caso, o calor é denominado o ativador da reação e, o peróxido de benzoíla, o iniciador. Segundo o autor, dois ciclos de termopolimerização são utilizados com sucesso: 1) processamento em banho de água quente com temperatura constante de 74ºC por 8 horas e 2) processamento a 74ºC por 2 horas seguido por mais uma hora a 100ºC. A polimerização das resinas acrílicas também pode ser iniciada por energia de microondas, tendo como principal vantagem a redução do tempo de polimerização, com propriedades físicas comparáveis àquelas descritas para as resinas termopolimerizáveis. Além dos métodos mencionados, a ativação química também pode ser utilizada para iniciar a polimerização das resinas acrílicas por meio da adição de uma amina terciária ao monômero, a qual promove a decomposição do peróxido de benzoíla. Uma das desvantagens das resinas quimicamente ativadas, em relação às termopolimerizáveis, é a maior quantidade de monômero residual, resultando na redução da resistência transversa e comprometendo sua biocompatibilidade.

Barbosa et al.[7], em 1998, realizaram uma revisão bibliográfica sobre a técnica de processamento de próteses odontológicas por meio de microondas. Assim, estudos levantados demonstraram que propriedades como a dureza, resistência transversal e porosidade das resinas polimerizadas por meio de microondas não são estatisticamente diferentes às das resinas convencionais. Outros estudos relataram que resinas convencionais, quando polimerizadas por meio de microondas, podem apresentar maior porosidade, enquanto que, as resinas designadas para esse processo de polimerização, parecem apresentar menor incidência de porosidade. Além disso, a polimerização por meio de microondas diminui os níveis de monômero residual em relação às outras resinas. Nessa revisão, verificou-se que a principal vantagem desse método é que se trata de uma técnica fácil, limpa e muito rápida. Pôde-se considerar como desvantagem, o preço relativamente alto e a baixa resistência das muflas não metálicas utilizadas.

Com o objetivo de avaliar a efetividade da polimerização de resinas acrílicas submetidas ao processamento através da energia de microondas na presença de metal, Braun et al.[11], em 1998, realizaram um estudo utilizando o teste de dureza superficial e dosagem de monômero residual. Para isso, foram confeccionados 36 corpos-de-prova medindo 30 mm de diâmetro e 4 mm de espessura, contendo no seu interior uma sela

metálica com 28 mm X 8 mm X 0,5 mm. Os corpos-de-prova foram divididos aleatoriamente em três grupos, submetidos aos seguintes processamentos: Grupo 1: prensagem da resina termopolimerizável Clássico, polimerizada em banho de água quente por 3 horas; Grupo 2: prensagem da resina Acron MC, polimerizada em forno de microondas por 3 minutos com potência de 500 W; Grupo 3: prensagem da resina termopolimerizável Clássico, polimerizada em forno de microondas por 3 minutos com potência de 500 W. Depois do acabamento e polimento, as amostras foram recortadas em duas metades aproximadamente iguais para realização dos testes de dureza, porosidade e determinação da quantidade de monômero residual. Para a determinação do monômero residual, uma metade de cada corpo-de-prova foi colocada individualmente em frascos contendo água deionisada que foram mantidos em estufa a 37ºC por 24 horas. A quantidade de mnômero residual foi determinada por meio de espectrofotometria a cada 24 horas até se completarem 188 horas. Os resultados obtidos mostraram que a sela metálica presente no interior da massa de resina acrílica, quando processada através da energia de microondas, não interfere na conversão de monômero em polímero, uma vez que as menores quantidades de monômero foram detectadas nas amostras dos Grupos 2 e 3, processadas através da energia de microondas. Os autores explicaram que esse fato acontece pelo tipo de aquecimento da resina, que ocorre devido à polarização das moléculas de monômero, as quais entram em freqüência com as ondas eletromagnéticas e

são movimentadas no interior da massa de forma não passiva. A medida que vai ocorrendo a polimerização, a quantidade de monômero vai sendo reduzida. Pôde-se verificar, também, uma maior liberação de monômero na água nos primeiros dias e que esta tende a diminuir com o tempo. Após o ciclo de polimerização, a concentração de monômero pode ser reduzida por dois mecanismos, difusão do monômero do interior da resina para a água ou polimerização adicional. Dessa forma, os autores concluíram que a energia de microondas pode ser utilizada para a polimerização de resinas acrílicas contendo no seu interior uma sela metálica, com menores conteúdos de monômero residual.

Para avaliar o efeito da temperatura e do tempo de polimerização no conteúdo de metacrilato de metila residual, Vallittu, et al.[79], em 1998, realizaram um estudo utilizando duas resinas autopolimerizáveis, cuja reação de polimerização é iniciada pelo ácido barbitírico (Palapress Vario e ProBase Cold) e duas termopolimerizáveis, iniciada pela ativação do peróxido de benzoíla (Lucitone 199 e ProBase Hot). Para isso, corpos-de-prova, na forma de discos, com 30 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram confeccionados com diferentes temperaturas e tempos de polimerização. Depois de polimerizados, foram acabados e polidos até atingirem a espessura de 1 mm aproximadamente. O conteúdo de metacrilato de metila residual de cada corpo-de-prova foi quantificado pela

cromatografia a gás e assim verificou-se o efeito do tempo e da temperatura de polimerização sobre liberação desse monômero para os quatro tipos de resina para bases de próteses. Os resultados mostraram que, para as resinas autopolimerizáveis, onde variou-se apenas a temperatura de polimerização, ocorreu alteração na quantidade de metacrilato de metila residual. Quanto maior a temperatura, menor a quantidade de monômero residual liberado. As resinas termoativadas, que foram polimerizadas a 100ºC, apresentaram redução na quantidade de monômero residual com o aumento do tempo de polimerização. Tais resinas, quando submetidas a diferentes ciclos de polimerização, apresentaram uma grande quantidade de metacrilato de metila residual na temperatura de 70ºC por 540 minutos. Isso pode ser explicado pelo fato de que, nessa temperatura, ocorre imobilização do metacrilato de metila, uma vez que a temperatura de transição vítrea do polímero não foi atingida, aumentando a quantidade de monômero residual. As resinas autopolimerizáveis apresentaram maior conteúdo de metacrilato de metila residual do que as termopolimerizáveis. Tal fato é devido à elevação da temperatura das resinas termopolimerizáveis, onde ocorre movimentos das cadeias moleculares, facilitando a polimerização do monômero. Assim, ciclos de aquecimento com temperaturas abaixo de 100ºC, produzirão polímeros com conteúdos de metacrilato de metila mais altos do que os aquecimentos maiores ou iguais a 100ºC.

Com o objetivo de comparar algumas propriedades mecânicas das resinas acrílicas em função dos diversos métodos de polimerização, Blagojevic e Murphy[10], em 1999, realizaram um estudo utilizando uma resina acrílica sem agente de ligação cruzada (TS1195), uma resina acrílica específica para polimerização em microondas (Acron MC) e uma resina acrílica convencionalmente polimerizada em banho de água quente. Tais resinas foram submetidas a dois métodos de polimerização: em microondas a 600 W por 3 minutos e em banho de água quente por 14 horas a 70ºC seguido por mais 3 horas em água em ebulição. Paralelamente, uma resina acrílica autopolimerizável comumente utilizada para reparos (Croform) foi testada nas seguintes condições: após autopolimerização e após autopolimerização seguida de polimerização complementar por meio de microondas a 600 W por 3 minutos. As resinas foram proporcionadas de acordo com as instruções dos fabricantes e submetidas aos métodos de polimerização propostos neste estudo. Para a quantificação do monômero residual, as amostras foram levadas para análise em cromatografia gás-líquida logo após confecção, ou seja, sem saturação em água. Os resultados mostraram que, para a resina Croform, o conteúdo de monômero residual foi reduzido em aproximadamente 4 vezes quando, após a autopolimerização, o material foi submetido à polimerização complementar em microondas. Em relação às outras resinas testadas, o ciclo longo de polimerização proposto em banho de água quente diminuiu a quantidade de monômero residual para

os três materiais, quando comparado à polimerização por meio de microondas, principalmente devido a cura terminal por 3 horas na água em ebulição.

Mello[53], em 1999, avaliou o efeito do aquecimento por microondas e água quente no nível de monômero residual de uma resina acrílica autopolimerizável e polida quimicamente, bem como sua influência na resistência transversa e na microdureza interna. Para a verificação do nível de monômero residual, corpos-de-prova no formato de metade de um disco com 30 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram confeccionados com a resina autopolimerizável Jet Clássico. Os corpos-de-prova foram divididos em 4 grupos: 1) as amostras foram polidas mecanicamente e não receberam nenhum tipo de polimerização complementar, 2) as amostras foram polidas quimicamente com fluido para polimento químico e também não receberam nenhum tipo de polimerização complementar, 3) as amostras foram polidas quimicamente e submetidas à polimerização complementar em microondas por 3 minutos a 450W e 4) as amostras receberam polimento químico e foram submetidas ao ciclo complementar em água quente por 1 hora a 65ºC. Para a avaliação da quantidade de monômero residual, os corpos-de-prova foram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo 17,5 ml de água deionizada e mantidos em estufa a 37ºC por períodos de 24 horas. Após esses períodos, as soluções foram retiradas e

analisadas em espectrofotometria até a estabilização da liberação do monômero residual. Os resultados mostraram que houve uma maior liberação de monômero no primeiro e no segundo dia. A diminuição da quantidade de monômero de acordo com o tempo é devido à sua difusão em água e à contínua polimerização por haver radicais ativos entre as cadeias, promovendo, dessa forma, a polimerização do monômero residual. Em relação ao grupo polido quimicamente que não recebeu polimerização complementar, o nível de monômero residual no primeiro dia foi 10 vezes maior que o grupo que recebeu polimento mecânico, isso porque o principal componente do líquido para polimento químico é o metil metacrilato. As polimerizações complementares em água ou em microondas reduziram a quantidade de monômero residual, porém, essa redução não foi equivalente à encontrada no grupo polido quimicamente. Diante dos resultados obtidos, o autor concluiu que o polimento químico aumenta a quantidade de monômero residual em resinas acrílicas e que os complementos de polimerização possibilitam uma redução no nível de monômero residual liberado em água.

Bartoloni et al.[9], em 2000, realizaram um estudo com o objetivo de determinar o grau de conversão de monômero em polímero de resinas acrílicas, com variação da técnica de polimerização. Os autores utilizaram uma resina de ciclo longo, polimerizada em água a 74ºC por 9 horas (Lucitone 199), uma polimerizada por meio de microondas a 500 W por

3 minutos (Acron MC) e outra de ciclo rápido, polimerizada em água a 100ºC por 20 minutos (Accelar 20). Três corpos-de-prova de cada resina foram confeccionados, de acordo com as instruções dos fabricantes, medindo 50 x 50 x 1 mm, servindo a resina Lucitone 199 como grupo controle. Logo após a demuflagem, os corpos-de-prova foram preparados para análise em espectrometria infravermelha. Os resultados mostraram que o grau de conversão da resina polimerizada por meio do ciclo rápido foi significativamente menor do que as outras resinas, porém, todos os materiais excederam a conversão de 90%, indicando um alto grau de conversão de monômero em polímero.

Oliveira[59], em 2001, avaliou a influência da posição e do número de muflas no forno de microondas sobre a liberação de monômero em água, dureza de superfície e porosidade de corpos-de-prova confeccionados com resina Acron MC. Para a verificação do monômero residual liberado, foram confeccionados corpos-de-prova medindo 32,5 mm X 10 mm X 2,5 mm após inclusão de matrizes de silicone em muflas plásticas. A resina acrílica foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante e, para a polimerização, as muflas foram divididas em 3 grupos: 1) uma mufla de cada vez, polimerizada a 500 W por 3 minutos na posição vertical, 2) duas muflas de cada vez, polimerizadas a 500 W por 3 minutos na posição vertical, tendo sido uma mufla colocada no centro e a outra na extremidade

do prato giratório e 3) duas muflas de cada vez, polimerizadas a 500 W por 3 minutos na posição vertical, tendo sido uma mufla colocada sobre a outra, no centro do prato giratório, separadas por um suporte próprio para microondas. Após acabamento e polimento, os corpos-de-prova foram colocados, individualmente, em tubos de ensaio contendo 6 ml de água deionizada e armazenados por 24 horas a 37ºC. Em seguida, as soluções aquosas foram retiradas para análise da presença de monômero residual por meio da espectrofotometria, tendo sido verificada após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Os resultados mostraram que houve um decréscimo na quantidade de monômero residual liberada de acordo com o tempo e que houve uma diferença significativa na liberação de monômero residual em água para o grupo 3, tendo uma maior quantidade para a mufla localizada em cima e uma menor quantidade para a mufla localizada em baixo devido a uma polimerização mais lenta e eficaz da mufla inferior e uma polimerização rápida da mufla superior, decorrente do impacto direto das microondas pela proximidade do magnetron. O autor concluiu que a posição das muflas no forno de microondas interfere na polimerização das resinas acrílicas quanto à liberação de monômero residual e que a colocação de duas muflas não interfere na polimerização desde que elas fiquem distribuídas horizontalmente sobre o prato de microondas.

Sabendo-se que o grau de conversão de monômero em polímero influencia as propriedades físicas das resinas acrílicas, Lee et al.[41], em 2002, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura, da pressão e do ambiente de polimerização (água ou ar), sobre a quantidade de monômero residual liberada e sobre a dureza de uma resina autopolimerizável (Alike) e de uma termopolimerizável (Namilon). Para o estudo, discos de resina foram confeccionados com 17 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Os corpos-de-prova da resina Namilon foram polimerizados em água em ebulição por 60 minutos e serviram como grupo controle positivo. Os corpos-de-prova da resina autopolimerizável foram confeccionados variando-se a temperatura (24ºC ou 50ºC), a pressão (sem pressão ou a 250kPa) e o ambiente em que ocorreu a polimerização (água ou ar). As amostras polimerizadas em condição ambiente (24ºC, sem pressão e no ar), serviram como grupo controle negativo. Após a confecção, os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada por 7 dias a 37ºC para a extração do monômero residual. Depois desse período, a quantidade de monômero residual foi determinada por meio da cromatografia líquida de alta performance. Os resultados mostraram que a resina autopolimerizável processada em condição ambiente (grupo controle negativo), liberou quantidade de monômero residual significativamente maior do que os outros grupos, com valores de dureza significativamente menores. Os corpos-de-prova polimerizados em água quente (50ºC), com ou sem pressão,

produziram menor grau de liberação de monômero residual com maiores valores de dureza melhorando, assim, as propriedades físicas e reduzindo os efeitos citotóxicos das resinas autopolimerizáveis.

2.2 Avaliação da citotoxicidade

Fisher[21], em 1954, dividiu as reações às resinas acrílicas utilizadas em odontologia em duas categorias: 1- dermatite alérgica de contato que atinge dentistas e técnicos de prótese e 2- estomatite alérgica que afeta os pacientes portadores de próteses. No que se refere à dermatite de contato, o autor descreve quatro casos de dentistas e técnicos de laboratório sensíveis ao monômero residual. Por meio de teste de contato, foi comprovado que esses profissionais apresentavam sensibilidade aos monômeros das resinas auto, termo e quimicamente ativadas. Dois desses profissionais eram portadores de próteses de resina termoativadas, porém, não apresentavam reação alérgica nos tecidos bucais, provavelmente pelo fato do monômero ter sido completamente polimerizado. Sobre a estomatite que afeta os portadores de próteses, foram avaliados 20 pacientes, dos quais quatro relataram apresentar alergia ao monômero e que tinham sido orientados para a substituição das mesmas. Para somente um desses pacientes confirmou-se a sensibilidade ao monômero residual. Neste

paciente, foi colocada uma prótese total com resina acrílica ativada pelo calor, adequadamente polimerizada, ocorrendo desaparecimento dos sintomas. Segundo os autores, as resinas termopolimerizáveis raramente provocam reações de sensibilidade ao monômero residual, ao contrário das autopolimerizáveis, as quais contém níveis suficientes do monômero para desencadear uma reação alérgica.

Axelsson e Nyquist[6], em 1962, realizaram um estudo com o objetivo de quantificar o monômero residual liberado de resinas acrílicas para bases de próteses assim como determinar os seus efeitos sobre os tecidos. Inicialmente, 44 pacientes desdentados com mucosa bucal saudável receberam novas próteses e apenas 28 desses pacientes foram examinados até o final do estudo. Durante a confecção das próteses, corpos-de-prova de 2 a 3 g foram obtidos simultaneamente dentro das mesmas muflas. O ciclo de polimerização utilizado foi de 20ºC a 70ºC por 30 minutos permanecendo a 70ºC por mais 2 horas. Depois da colocação das próteses, a mucosa dos pacientes foi analisada visualmente uma vez por dia durante uma semana e após 1, 3 e 6 meses de utilização das mesmas. Para determinar a quantidade de monômero residual, os corpos-de-prova e as próteses foram submetidos a análises químicas. Os resultados demonstraram que, em 24 dos 28 casos analisados, ocorreu uma diminuição na quantidade de monômero residual liberada ao longo do tempo e para 20 casos a liberação

de monômero foi significativa. Durante a primeira semana de utilização das próteses, 34 dos 44 pacientes apresentaram hiperqueratoses e não foram observadas estomatites protéticas. No presente estudo, os autores não puderam confirmar se existe relação entre monômero residual liberado e estomatite protética ou hiperqueratose, necessitando-se de mais pesquisas.

Leirskar e Helgeland[48], em 1972, realizaram um experimento com o objetivo de estabelecer um teste de biocompatibilidade de alguns materiais dentários, utilizando cultura de células. Foram avaliados o crescimento celular próximo ao material, a adesão e o crescimento na superfície do material após longo período de contato. Foram preparados corpos-de-prova, na forma de discos com 30 mm de diâmetro e 1 mm de espessura dos seguintes materiais: liga de ouro (Gamma cast golg), amálgama de prata (DAB Standard Alloy), amálgama de cobre (Silbrin), duas resinas acrílicas termopolimerizáveis (QC 20 e Bliodent), cimento de silicato (Bio-Trey 9) e resina composta Addent 12. Com exceção da liga de ouro, os discos foram avaliados após 6 dias da confecção. Para a esterilização dos discos, os mesmos foram lavados em água destilada e tratados com atmosfera com 15% de óxido de etileno no ar por 30 minutos, menos os discos de cimento de silicato, que foram enxaguados em meio estéril contendo antibióticos para evitar a desidratação e rachaduras. Discos de poliestireno foram utilizados como grupo controle. Os discos foram, então,

colocados no centro de placas de Petri (100 x 20 mm) esterilizadas. Em seguida, 2 x 10^6 células e 25 ml de meio de cultura foram transferidos para cada placa e armazenados a 37ºC com atmosfera com CO_2 no ar. As células utilizadas foram fibroblastos de hamster (L 929) e células epiteliais humanas (NCTC 2544) propagadas em meio de cultura Eagle acrescido de 10% de soro fetal bovino. Para análise do crescimento celular, as células foram contadas e realizou-se a estimativa do conteúdo de DNA em dois momentos: 1- no meio de cultura que foi removido das placas de Petri contendo os discos após 1, 3 e 6 dias e 2- nas células desprendidas dos corpos-de-prova após tratamento com tripsina (utilizada para desprender as células aderidas em alguma superfície). Os resultados desse estudo mostraram que as resinas acrílicas e a liga de ouro não inibiram o crescimento celular ao redor dos discos. Porém, o crescimento na superfície dos discos de resina foi menor do que o grupo controle para os fibroblastos de hamster após 24 horas de incubação e para os outros períodos o crescimento foi similar ao grupo controle. Ao redor dos discos de cimento de silicato houve uma inibição do crescimento de fibroblastos de hamster, sendo significativamente mais baixo após 3 dias provavelmente devido à liberação de ácido fosfórico. Após 6 dias, porém, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. O crescimento celular na superfície dos discos de silicato também foi inibido em relação ao grupo controle, assim como a síntese de DNA. Tanto para o amálgama de prata como para o de cobre não foi encontrada

inibição do crescimento celular ao redor dos discos, porém, na superfície dos mesmos, o efeito citotóxico foi observado. Ao redor dos discos de Addent 12, o crescimento celular foi significativamente reduzido para ambos os tipos de células e a quantidade de DNA obtida, após 6 dias de incubação, foi de 50 a 70% do grupo controle. Os autores concluíram que o presente método é uma técnica simples para contagem das células e avaliação da adesão celular nos materiais dentários. O mais importante aspecto do método de cultura de células, porém, é a possibilidade de estudar o mecanismo de interação entre o material dentário e as células, tanto para a adesão como para avaliar o efeito das substâncias liberadas sobre o metabolismo celular.

Nagem Filho et al.[54], em 1973, avaliaram a toxicidade de uma resina acrílica termopolimerizável polida quimicamente em comparação com a mesma resina polida pelo método convencional. Assim, amostras dessa resina foram implantadas em tecido subcutâneo das regiões dorsal e pélvica de cobaias e, após 2, 16 e 32 dias, os tecidos circunvizinhos foram avaliados microscopicamente. A análise dos tecidos mostrou maior reação tecidual, nos dois primeiros dias, aos implantes polidos quimicamente. Essa alteração foi atribuída a um provável aumento na quantidade de monômero residual. Entretanto, ao final dos 32 dias, todos os implantes de resina acrílica apresentaram características semelhantes, permitindo concluir que a

resina acrílica ativada termicamente é bem tolerada pelo tecido conjuntivo do rato, independente do tipo de polimento utilizado.

Um fator importante no estudo da toxicidade in vitro é o adequado contato entre as células e os materiais testados. Sendo assim, Wennberg et al.[83], em 1979, demonstraram uma técnica para a verificação da citotoxicidade de materiais odontológicos com a utilização de filtros Millipore. Para isso, fibroblastos de hamster (L 929) e células epiteliais humanas (HeLa) foram propagadas em meio de cultura Eagle acrescido de 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 μl/ml de estreptomicina. Após 2 dias de incubação, meio de cultura fresco foi adicionado tendo sido a concentração final de células de 1,5 x 10^5 cel/ml. Em seguida, filtros Millipore com 47 mm de diâmetro com poros de 0.45, 3 ou 8 μm foram colocados sobre as placas com 50 mm de diâmetro e cobertos com 6 ml da suspensão de células. Para a formação de uma monocamada de células sobre a membrana, o conjunto foi armazenado por 24 horas a 37ºC com 5% de CO_2 no ar. Depois desse período, o meio de cultura foi aspirado, colocou-se novo meio contendo 1.5% de Bacto-ágar e aguardou-se sua solidificação. Após a solidificação, a membrana e o ágar foram separados de cada placa e recolocados de maneira invertida. Dessa forma, as células ficaram para baixo e a membrana para cima. Em seguida, os

corpos-de-prova dos materiais testados foram colocados sobre as membranas Millpore, imediatamente após a mistura ou após um período de 5, 15 ou 60 minutos ou 24 horas. Os materiais testados foram: resina acrílica autopolimerizável Sevriton, cimento de silicato Super Syntrex e cimento de fosfato de zinco Pharmacent. Discos de teflon serviram como grupo controle negativo. Foi colocado um corpo-de-prova de cada material sobre cada membrana Millipore e para cada grupo foram realizados 5 experimentos. Os materiais testados permaneceram em contato com os filtros Millipore por um período de 24 horas. O efeito citotóxico foi analisado microscopicamente, após a coloração das células com eosina e hematoxilina e macroscopicamente através da formação do halo de inibição. A análise microscópica mostrou que, para todos os materiais, após 24 horas, havia confluência entre as células, ou seja, não havia espaços entre as mesmas. As células em contato com a membrana Millipore com poros de 0.45 μm mostraram-se morfologicamente normais. Porém, as que estavam em contato com as membranas com poros de 3.0 e 8.0 μm mostraram-se morfologicamente danificadas com citoplasma contraído e vacuolização. Na análise macroscópica, para a resina acrílica, ocorreu a formação do halo de inibição para os corpos-de-prova colocados imediatamente após a mistura. Após 5 minutos ou mais, ocorreu a formação de células sob a membrana. O cimento de silicato mostrou-se citotóxico em todos os períodos e o cimento

de fosfato de zinco apresentou efeito citotóxico às células logo após a mistura e, após 24 horas, um pequeno efeito ainda estava presente. Os discos de teflon colocados sobre as membranas não causaram danos às células vistos micro e macroscopicamente. O teste realizado nesse estudo para análise da citotoxicidade de alguns materiais foi considerado simples e rápido, porém, mais informações sobre o crescimento ou morte celular podem ser obtidas com testes mais detalhados.

Havendo vários relatos de reações na mucosa em pacientes portadores de próteses desde a década de 30, quando foram introduzidas as resinas acrílicas, Weaver e Goebel[81], em 1980, realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de elucidar tais relatos relacionados com os componentes liberados pelas resinas. Segundo os autores, as reações da cavidade bucal apresentam como sintomas ardência na língua, vermelhidão e erosão na mucosa. As causas mais prováveis desses sintomas são traumas causados por próteses mal adaptadas, doenças sistêmicas ou bucais não relacionadas com as resinas acrílicas, como a candidose, e irritação química local e hipersensibilidade causadas pelas resinas acrílicas e seus constituintes. Alguns estudos mostraram que o monômero metil metacrilato pode causar reação de hipersensibilidade e irritação química local quando não totalmente polimerizado, sendo as resinas autopolimerizáveis as maiores responsáveis por essas reações. Assim, as

resinas termopolimerizáveis são mais indicadas na confecção de próteses, tendo como objetivo minimizar as reações na mucosa bucal.

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de resinas acrílicas para bases de próteses de acordo com o método de processamento, tipo de polímero e condições de armazenagem, Hensten-Pettersen e Wictorin[25], em 1981, realizaram um estudo utilizando as resinas SR 3/60, Dura-Flow (termopolimerizáveis), Swe-Flow, Palacast, Quick 20 Pink e quick 20 Clear (autopolimerizáveis). Para isso, corpos-de-prova na forma de discos, com 40 mm de diâmetro e 4 mm de espessura, foram confeccionados de acordo com as instruções dos fabricantes. Para cada tipo de polimerização, auto e termo, dois tipos de processamento foram realizados. Os corpos-de-prova de resina termopolimerizável foram submetidos a um ciclo de 30 minutos a 73ºC seguido por mais 30 minutos a 100ºC e outro ciclo de 9 horas a 73ºC. Os corpos-de-prova de resina autopolimerizável foram polimerizados por 1 hora a 21ºC ou por 30 minutos sob pressão de 2 kp a 45ºC. Os corpos-de-prova foram divididos em três grupos de acordo com as condições de armazenagem. Alguns foram colocados em meio de cultura, outros foram armazenados em solução salina por períodos de 1 a 4 dias e outros colocados em recipientes e armazenados em atmosfera com umidade relativa por 2 semanas. Discos de vidro com as mesmas dimensões serviram como grupo controle negativo para cada condição. Depois do período de

armazenagem, os corpos-de-prova foram colocados em meio de cultura Eagle contendo células epiteliais humanas (NCTC 2544) e incubados a 37ºC em umidade atmosférica com CO_2. A multiplicação celular sobre a superfície dos discos foi verificada por meio de contagem celular em um celoscópio (Celloscope 101). Os resultados mostraram que os diferentes métodos de processamento não influenciaram significativamente no efeito citotóxico. De acordo com o tipo de polimerização, o crescimento celular foi menor para as resinas autopolimerizáveis em relação às termopolimerizáveis e para ambas o crescimento celular foi menor em relação ao grupo controle.

Nakamura e Kawahara[55], em 1984, realizaram um estudo com o objetivo de determinar a citotoxicidade das resinas dentais termopolimerizáveis Natural Resin nº 2 e Natural Resin nº 0 e das resinas autopolimerizáveis Polybase S nº 30, Rebaron nº 3 e Orthodontic Resin, armazenadas por longos períodos de tempo. Para o estudo, foram produzidos extratos por meio do contato entre as amostras de resinas, esterilizadas em luz ultravioleta, e o meio de cultura MEM, por, no mínimo, 2 semanas e, no máximo, 20 semanas. Os efeitos dos extratos sobre o crescimento das células HeLa S3 foram verificados por meio da análise da formação de colônias. A média de crescimento foi obtida e escores foram utilizados para determinação da citotoxicidade dos materiais (0 = crescimento

de 100% ou mais, 1 = crescimento de 75% a 99%, 2 = crescimento de 50% a 74%, 3 = crescimento de 25% a 49%, 4 = crescimento de 1% a 24% e 5 = 0% de crescimento). Os resultados mostraram que, para a resina Natural Resin nº 2, em quase todos os períodos de tempo, a citotoxicidade foi baixa (escores 0 e 1), com exceção da segunda semana, onde o escore obtido foi 2. Para a resina Natural Resin nº 0, os resultados foram similares ao da resina Natural Resin nº 2, com escores de citotoxicidade entre 0 e 1. A citotoxicidade da resina autopolimerizável Polybase S nº 30 teve escores de 0 ou 1, com exceção da segunda, oitava e décima quarta semanas, onde o escore foi 2 e os escores de citotoxicidade obtidos pela resina Rebaron nº3 foram de 0 e 1, com exceção da segunda, onde o escore foi 2. Já para a resina autopolimerizável Orthodontic Resin, o escore 2 de citotoxicidade foi obtido na segunda e décima semanas, tendo os outros períodos apresentado escores 0 e 1. Baseado nos dados dos cinco produtos testados, pôde-se concluir que, para quase todos os períodos, os escores de citotoxicidade foram de 0 e 1, tendo para a segunda semana uma maior citotoxicidade com escore 2, fato explicado pela dissolução do monômero residual em água com o tempo transcorrido.

Os fatores etiológicos da sensação de ardência na boca incluem infecção por candida, alergia ou irritação decorrentes do uso de

próteses, alterações hormonais, desordens pisicogenéticas, xerostomia, anemia e diabetes mellitus. Sendo assim, com o objetivo de correlacionar a sensação de ardência bucal com o uso de próteses, Ali et al.[2], em 1986, realizaram um estudo com 22 pacientes que utilizavam próteses superiores e que apresentavam sintoma de ardência. Os pacientes responderam a um questionário completo, foram submetidos a um teste para determinar se eram alérgicos ao metacrilato de metila ou a algum outro componente das resinas acrílicas, foi observado se havia ou não inflamações ou ulceras na mucosa e o teste de cultura de células foi usado para detectar a presença de *candida albicans* na prótese ou no palato. As próteses foram examinadas de acordo com a adaptação, estabilidade e oclusão. Além disso, foram submetidas ao teste da cromatografia gás/líquido para estimativa do monômero residual liberado. Como grupo controle foram examinados 22 pacientes que não apresentavam sensação de ardência. Os resultados mostraram que todos os pacientes coincidiram os sintomas de ardência com a utilização das próteses. Falhas nas prótese em relação à adaptação, estabilidade e oclusão foram encontradas em 12 das 22 próteses do grupo experimental e 19 das 22 próteses do grupo controle. Quanto à infecção por candida, nenhuma evidência foi verificada para todos os pacientes. Já em relação à anemia, 3 pacientes apresentaram-se com esse distúrbio. A correção dessa anormalidade resultou em redução ou resolução da sensação de ardência. O teste psicológico relatou que 11 dos 22 pacientes do grupo experimental

apresentavam perfil de personalidade instável, sendo que 4 desses pacientes não conseguiram identificar o local ou a causa do desconforto. No grupo controle, 4 dos 22 pacientes apresentavam perfil de personalidade instável. Em relação ao monômero residual liberado, 16 próteses dos pacientes do grupo experimental apresentaram de 0 a 3% de monômero liberado, sendo que para 5 desses pacientes o teste da reação alérgica foi positivo. A redução do monômero residual resultou em resolução dos sintomas de ardência para 4 desses pacientes. Para o grupo controle, 11 próteses apresentaram quantidade significativa de monômero residual liberado. Contudo, concluiu-se que o monômero residual liberado não é o único responsável por causar ulceras ou inflamações na mucosa. Porém, quando pacientes com risco de sensibilidade às resinas acrílicas forem identificados, as próteses devem ser adequadamente polimerizadas para a redução da quantidade de monômero residual liberada.

Wennberg[82], em 1986, realizou uma revisão de literatura com o objetivo de analisar diferentes métodos de citotoxicidade e discutir alguns problemas a eles relacionados. Em relação aos materiais testados, são possíveis dois tipos de contato com as células: o contato direto da substância insolúvel ou solúvel em água por meio da obtenção de extratos e o contato indireto por meio da utilização de ágar ou membranas Millipore, chamados de intermediários permeáveis. Quando da utilização de extratos para a

realização dos testes de citotoxicidade, o autor relatou a importância de se controlar os fatores que influenciam nos resultados de obtenção dos mesmos, tais como o tipo e o volume do meio, a área do corpo-de-prova, o tempo e a temperatura para a extração. O meio para a extração pode ser água destilada, solução salina ou meio de cultura com ou sem soro fetal. A quantidade do material testado colocado para a obtenção do extrato pode ser expressa em tamanho ou em peso e a concentração do extrato depende da relação entre a superfície do corpo-de-prova e o volume do meio utilizado. A temperatura geralmente utilizada é de 37ºC e o tempo para a obtenção do extrato varia entre 1 hora e 2 semanas. Na sua revisão de literatura, o autor relatou ainda, que diferentes parâmetros podem ser usados para verificar a citotoxicidade dos materiais, tais como o crescimento celular, alteração do metabolismo, permeabilidade e lise celular. O crescimento celular pode ser analisado por meio de contagem de células ou verificação da formação de colônias. Já as funções metabólicas podem ser verificadas por meio da análise da síntese de DNA, respiração celular, alteração da atividade enzimática ou pela verificação da produção de lactato. Contudo, o autor concluiu que os testes de citotoxicidade são simples, rápidos e, a maioria, não requer equipamento especializado. Além disso, destacou a importância dos testes de citotoxicidade iniciais em cultura de células, em animais e dos estudos clínicos para a verificação da citotoxicidade dos materiais dentários.

Hensten-Pettersen[24], em 1988, realizou uma revisão de literatura com o objetivo de comparar os métodos que avaliam a citotoxicidade dos materiais dentários. O autor relatou que diferentes métodos podem ser usados para monitorar os efeitos citotóxicos, como a inibição do crescimento celular, a citólise, as modificações na membrana ou no citoplasma e as alterações na atividade metabólica. Além disso, explicou que os testes de citotoxicidade podem ser divididos em iniciais, os quais envolvem o método de cultura de células, testes secundários, que incluem os estudos com implantação dos materiais testados em tecidos subcutâneos, testes de sensibilidade e irritação da membrana mucosa e os testes pré-clínicos, que verificam a irritação pulpar e os implantes dentais. Dentre os testes utilizados para a análise da citotoxicidade dos materiais dentários, temos o método de incorporação de ^{3}H-timidina, o qual mede a síntese de DNA das células viáveis. Muitos testes de citotoxicidade são realizados por meio da utilização de extratos, obtidos a partir do contato entre as amostras dos materiais e o meio de cultura. Quando da obtenção de extratos, o autor relatou alguns dos fatores que podem influenciar nos resultados, como o tempo e a temperatura para a extração e a média entre o volume do meio e a superfície do corpo-de-prova. Contudo, o autor concluiu que alguns materiais dentários apresentaram-se tóxicos em alguns estudos e não tóxicos em outros, dependendo das condições em que os testes foram realizados,

mostrando, assim, a necessidade da padronização dos testes de citotoxicidade.

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

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

Lefebvre et al.[44], em 1991, desenvolveram um estudo com o objetivo de comparar a biocompatibilidade de resinas acrílicas fotopolimerizáveis para bases de próteses, bem como avaliar o efeito do tempo de polimerização dessas resinas em células epiteliais orais. Além disso, os autores citaram algumas vantagens da utilização de resinas fotopolimezáveis na confecção de bases de próteses, tais como a ausência de metil metacrilato livre, facilidade na fabricação e manipulação, características superiores de resistência e maior aceitação pelo paciente. Para o estudo, foram utilizadas as resinas fotopolimerizáveis Triad, Astron LC hard e Extoral e uma resina termopolimerizável, a base de metil metacrilato, Lucitone 199. Foram confeccionados corpos-de-prova na forma de discos

com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, de acordo com as instruções dos fabricantes e em condições assépticas. Alguns corpos-de-prova foram confeccionados sem barreira para o ar, outros com barreira e alguns com barreira e posterior remoção com lavagem em água estéril. Para verificar a influência do tempo de polimerização, os corpos-de-prova foram divididos em dois grupos: no primeiro grupo, as amostras foram polimerizadas, de acordo com as instruções dos fabricantes, por 5 minutos e no segundo grupo, foram polimerizadas por 10 minutos. Os corpos-de-prova da resina Lucitone 199 foram polimerizados termicamente de acordo com as instruções do fabricante e, juntamente com discos de polietileno, serviram como grupos controle. Uma suspensão de 3,5 x 10^5 células epiteliais orais de hamster em 3 ml de meio de cultura DMEM foi colocada em placas de cultura sobre os discos de resina individualmente e armazenadas por 24 horas a 37ºC em atmosfera com 5% de CO_2. Depois do período de incubação, o meio de cultura foi removido e 20 μCi/ml de uma substância radioativa foram incorporadas e, após 24 horas, a síntese de proteína foi analisada no contador cintilográfico. Os resultados mostraram que todas as amostras de resina Triad foram significativamente mais inibitórias do que os discos de polietileno ou de resina Lucitone 199, com exceção dos polimerizados por 5 minutos e lavados em água esterilizada para remoção da barreira de ar. Já a resina Asron LC hard produziu menor inibição do crescimento celular do que a resina Triad, com

exceção das amostras polimerizadas por 5 ou 10 minutos com a utilização de barreira para o ar. A resina Extoral promoveu menor inibição do crescimento celular quando comparada às outras duas resinas fotopolimerizáveis, tendo sido os resultados aproximados dos obtidos pelas amostras dos grupos controle. Foi observado também, que, ao contrário do que ocorreu para as amostras de resina Triad e Astron LC hard, a utilização da barreira de ar produziu menor inibição do crescimento celular, sendo considerada um agente protetor, mostrando a necessidade de mais estudos. O efeito do tempo de polimerização foi insignificante para este estudo, talvez pela espessura mínima das amostras, podendo ser clinicamente significativo devido ao aumento da espessura das próteses. Os autores concluíram que as resinas fotopolimerizáveis utilizadas neste estudo tem efeito citotóxico sobre as células epiteliais orais de hamster. Tal efeito teria influencia das formulações de cada resina e não do tempo utilizado para a polimerização, necessitando de mais estudos para a confirmação dos resultados.

Okita e Hensten-Pettersen[58], em 1991, avaliaram a citotoxicidade dos condicionadores de tecido, classificados como metacrilatos e similares às resinas para base de próteses convencionais. Para isso, foram confeccionados corpos-de-prova de quatro condicionadores de tecido (Coe Comfort, GC Soft-Liner, Kerr FITT e Visco-Gel) com 12 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, em condições assépticas e de acordo com as instruções

do fabricante. Os corpos-de-prova foram armazenados em meios de cultura Eagle sem soro fetal bovino ou antibióticos por 1 hora, 24 horas, 8 e 15 dias à temperatura de 37ºC. Paralelamente, fibroblastos de hamster (L929) foram propagados em Eagle suplementado com bicarbonato, 5% de soro fetal bovino, 100 μg/ml de penicilina, 100 IU/ml de estreptomicina e 1,25 μg/ml de anfotericina B. Depois de 2 dias de incubação, foi adicionado ágar para solidificação do meio. Após a solidificação, os corpos-de-prova foram colocados sobre a superfície do ágar. A esse conjunto foram adicionadas as amostras contendo as substâncias liberadas pelos condicionadores. Após 24 horas de incubação a 37ºC em umidade atmosférica de 4% de CO^2, as culturas foram examinadas no microscópio invertido analisando-se a lise e alterações celulares. Discos de polietileno foram utilizados como grupo controle negativo e de polivinilclorido como positivo. Como resultado, foi observado que o grupo controle negativo não causou alterações morfológicas nas células e que o positivo causou severa lise e alteração celular. Todos os condicionadores utilizados no presente estudo foram tóxicos às células e, no período de 15 dias, não houve diminuição significativa da citotoxicidade, período esse que não excede a recomendação para a aplicação clínica dos condicionadores.

Pelo fato dos testes de citotoxicidade in vitro apresentarem um grande número de métodos e materiais, as normas da International Standard Organization (ISO) 10993-5[28](1992) padronizam esses testes e selecionam o método para análise da citotoxicidade mais apropriado para cada material testado. Com isso, três categorias de testes foram listadas: o teste que utiliza extratos, o teste onde há o contato direto do material testado com as células utilizadas e o teste onde o contato é indireto, por meio da difusão em ágar ou filtros Millipore. Os diferentes métodos que avaliam a citotoxicidade dos materiais testados podem ser agrupados em categorias de acordo com o tipo de análise, tais como a avaliação dos danos pela morfologia celular, medida das células danificadas, medida do crescimento celular e medida de aspectos específicos do metabolismo celular. Os grupos controle negativo e positivo são bem definidos nessas normas, sendo o primeiro responsável por não provocar citotoxicidade, como, por exemplo, discos de polietileno e o segundo responsável por promover a citotoxicidade, como o polivinilclorido. Quando da produção de extratos, alguns tempos e temperaturas são recomendados, sendo que na temperatura de 37ºC, o tempo não deve ser menor do que 24 horas. Além disso, a média entre a superfície do corpo-de-prova e o volume do meio utilizado para a extração deve estar entre 6 cm^2/ml e 0,5 cm^2/ml. O tipo de célula L 929 é uma das linhagens recomendadas pela ISO 10993-5 para a realização dos testes de citotoxicidade. Contudo, a citotoxicidade dos materiais testados pode ser

determinada quantitativamente, por meio da verificação do número de colônias, proliferação ou inibição celular ou qualitativamente, pela utilização da microscopia, onde são observadas a morfologia, vacuolização e lise celular.

As resinas para bases de prótese podem ser classificadas em termopolimerizáveis, autopolimerizáveis, polimerizadas por meio de microondas e por meio de luz visível. Sendo assim, Barron et al.[8], em 1993, realizaram um estudo com o objetivo de verificar o efeito citotóxico das resinas para bases de próteses polimerizadas por meio de luz visível e compará-lo com o efeito das resinas termopolimerizáveis. As resinas utilizadas para esse estudo foram: Triad (fotopolimerizável), Astron, Extoral (resinas do tipo dual) e Lucitone 199 (termopolimerizável) como grupo controle. Corpos-de-prova, na forma de discos, foram confeccionados com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, de acordo com as instruções dos fabricantes e em condições assépticas. A seguir, foram colocados em placas contendo 3 ml de meio de cultura DMEM e 4,5 x 10^5 células epiteliais orais de hamster. Após 24 horas de incubação a 37ºC em atmosfera com 5% de CO_2 no ar, as culturas de células foram examinadas microscopicamente por contraste de fases. A monocamada celular foi avaliada para determinar a toxicidade celular utilizando os seguintes parâmetros: 1- perda de ligação com o disco, 2- arredondamento celular, 3- inibição celular ao redor do disco

e 4- confluência (espaços entre as células). Além disso, a síntese de DNA e RNA foi analisada por meio da incorporação de radioisótopos e posterior leitura em um contador cintilográfico para verificação do efeito citotóxico dos materiais testados. Através da observação microscópica, observou-se que as células expostas aos corpos-de-prova das resinas fotopolimerizáveis apresentaram características morfológicas não normais, com formas arredondadas, borda da membrana celular irregular e perda de ligação com os discos, sugerindo citotoxicidade desses materiais. As células em contato com os corpos-de-prova da resina termopolimerizável, apresentaram-se morfologicamente normais. Os materiais fotopolimerizáveis inibiram a síntese de RNA e de DNA das células epiteliais orais em maior extensão do que a resina termopolimerizável. Os autores observaram, também, que o efeito citotóxico dos materiais pode diminuir com o aumento do tempo de polimerização. Dessa forma, concluiu-se que as resinas para bases de próteses polimerizadas por luz visível podem afetar a duplicação celular, podendo resultar em comprometimento da mucosa e, eventualmente, causar ulceras, estomatites e infecções em indivíduos que fazem uso de prótese.

Lefebvre et al.[43], em 1994, realizaram um estudo para examinar o efeito das substâncias liberadas por 4 resinas para bases de próteses fotopolimerizáveis (Triad, Triad High Flow, Astron LC Hard e Extoral) e uma resina termopolimerizável (Lucitone 199) sobre células

epiteliais orais de hamster propagadas em meio de cultura DMEM acrescido de 5% de soro fetal bovino, 100U/ml de penicilina e 100μg/ml de estreptomicina incubadas a 37ºC em atmosfera com 5% de CO_2 no ar. Três corpos-de-prova de cada resina acrílica, na forma de discos, foram confeccionados com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura de acordo com as instruções dos fabricantes, colocados em frascos de vidro com 9 ml de meio de cultura DMEM suplementado e levados para uma mesa giratória (100 rpm) por 24 horas. Após esse período, os discos foram transferidos para meio de cultura fresco aí permanecendo por 10 dias. As substâncias liberadas durante as primeiras 24 horas e durante os próximos 10 dias no meio de cultura foram utilizadas nos testes de citotoxicidade. Três mil células epiteliais de hamster, 50 μl de meio de cultura contendo as substâncias liberadas e 50 μl de meio de cultura fresco foram colocados em placas de cultura com 96 orifícios para cada período e material testado. Para a análise da citotoxicidade, foi realizado o teste MTT que verifica a produção de enzima desidrogenase mitocondrial, sendo que essa produção é considerada reflexo do número de células viáveis. Dessa forma, quanto maior a atividade dessa enzima, maior será o número de células viáveis. Outro teste realizado neste estudo para a análise da citotoxicidade foi a monitorização da síntese de RNA. Os resultados mostraram que os componentes liberados pelas resinas acrílicas termo ou fotopolimerizáveis podem causar efeito tóxico às

células epiteliais orais, sendo que nas primeiras 24 horas a inibição celular é maior. Além disso, diferentes substâncias podem ser liberadas em diferentes concentrações, alterando as propriedades fisico-químicas desses materiais. O efeito citotóxico pode continuar após dias da polimerização, porém, este efeito pode ser minimizado se as próteses forem armazenadas em água por um período de 24 horas antes da colocação no paciente.

Lefebvre e Schuster[42], em 1994, realizaram uma revisão de literatura sobre resinas para bases de próteses para avaliar o efeito do tipo de polimerização, do conteúdo de carga inorgânica, da aplicação da camada seladora antes e após a polimerização e de substâncias liberadas após a polimerização na biocompatibilidade. Os trabalhos avaliados estudaram as seguintes resinas: Triad (fotopolimerizável), Lucitone 199 (termopolimerizável), Extoral e Astron (resinas do tipo dual). Foram confeccionados corpos-de-prova na forma de discos com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Para a verificação da citotoxicidade desses materiais, os corpos-de-prova foram colocados em culturas de células epiteliais orais de hamster e, após determinado período de incubação, o metabolismo celular foi analisado. Os resultados mostraram que a resina Extoral, do tipo dual, promoveu menor inibição do crescimento celular em relação aos outros materiais testados. As resinas Triad (fotopolimerizável) e Astron (do tipo dual) mostraram-se significativamente mais citotóxicas. Para avaliar o efeito do tipo

de polimerização na citotoxicidade, o grau de conversão de monômero em polímero foi verificado, onde a resina Triad atingiu 77% de conversão contra 97% da resina Astron. Foi observado também que, quanto maior o tempo de polimerização, há maior conversão de monômero em polímero. Com o objetivo de melhorar a biocompatibilidade das resinas, os fabricantes recomendam a utilização de selantes (Palaseal e Extoral) que são aplicados após a polimerização. Quando comparados às resinas avaliadas, o selante Palaseal se mostrou menos compatível e o Extoral, menos citotóxico. Dessa forma, a utilização de selantes menos tóxicos que as resinas aumenta sua biocompatibilidade. Os autores avaliaram, também, o tipo e a biocompatibilidade dos produtos liberados pelas resinas imediatamente após a polimerização e após 30 dias de armazenamento. Assim, foram detectadas várias substâncias liberadas e, após dias de armazenamento, houve uma redução dessa liberação, o que sugere que tais substâncias podem ser voláteis, diminuindo sua citotoxicidade com o tempo.

Em 1994, Tsuchiya et al.[76] realizaram um estudo com a proposta de determinar a quantidade de formaldeído e de metacrilato de metila residual liberados pelas resinas acrílicas, assim como sua citotoxicidade. Dessa forma, foram confeccionados corpos-de-prova, com 8,5 mm de diâmetro e 2 mm de altura, com três diferentes tipos de resina (Rebaron nº 3 autopolimerizável, Acron nº 8 termopolimerizável e Acron MC

nº 8 polimerizada por meio de microondas) e submetidos a diferentes testes. Alguns foram colocados na cavidade oral de indivíduos saudáveis e outros foram imersos em saliva artificial. Os discos de resina autopolimerizável foram colocados na cavidade oral para estimulação da saliva por 5 minutos. Para quantificar o formaldeído liberado, foi utilizada a análise de injeção de fluxo. A quantidade de metacrilato de metila foi analisada pela cromatografia líquida. Para análise da citotoxicidade, soluções de formaldeído ou metacrilato de metila foram misturadas ao meio de cultura contendo células na concentração de 6,0 x 10^6 células/ml e incubadas à 37ºC por 2, 3 e 5 dias. Os resultados obtidos foram comparados ao número de células do grupo controle (células incubadas na ausência de substâncias liberadas pelos discos). Para se testar um método que promovesse a liberação prévia de formaldeído e de metacrilato de metila, as técnicas de quantificação de produtos tóxicos e de citotoxicidade, descritas anteriormente, foram também aplicadas à discos de resina autopolimerizável imersos em água a temperatura ambiente, 20ºC ou 50ºC por 60 minutos. Os resultados mostraram que ocorreu liberação de formaldeído e de metacrilato de metila em todas as imersões e que o conteúdo liberado in vitro foi maior do que o in vivo. Observou-se também que há uma maior liberação de produtos pelas resinas autopolimerizáveis do que pelas resinas polimerizadas pelo calor e por meio de microondas. Em relação ao teste de citotoxicidade, tanto o formaldeído como o metacrilato de metila foram tóxicos às células, porém, o

formaldeído mostrou ser citotóxico em menores concentrações. A imersão em água reduziu a quantidade de subprodutos liberados. Assim, a imersão das próteses de resina acrílica em água a 50ºC antes da instalação, pode diminuir seu potencial citotóxico.

Lefebvre et al.[46], em 1995, realizaram um estudo para verificar os efeitos do pH na biocompatibilidade das resinas para bases de próteses fotopolimerizáveis em comparação com as termopolimerizáveis. As resinas selecionadas foram: Lucitone 199 (termopolimerizável), Triad (fotopolimerizável) e Extoral (resina dual). Os materiais testados foram manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes. Os corpos-de-prova foram obtidos em condições assépticas, com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura e colocados em soluções com pH de 4.0, 5.0 ou 6.8, permanecendo por 5 dias. A seguir, meio de cultura DMEM acrescido de 5% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 μl/ml de estreptomicina foi adicionado a cada solução com diferentes pHs. Três mil células epiteliais orais, propagadas previamente, 50 μl de meio de cultura contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova e 50 μl de meio de cultura fresco foram colocados em placas de cultura com 96 orifícios e armazenadas por 24 horas. Após esse período, o metabolismo celular foi monitorado através da análise da síntese de RNA. A resina Lucitone 199, exposta à

solução com pH igual a 4.0 durante um dia, provocou inibição significativa da síntese de RNA. Para a resina Triad, todos os valores de pHs promoveram, durante os primeiros dias, redução da síntese de RNA. Os produtos liberados pela resina Extoral se mostraram significativamente citotóxicos durante o primeiro e o segundo dia para todas as concentrações de pHs.

Schuster et al.[65], em 1995, realizaram um estudo com o objetivo de analisar o efeito das substâncias liberadas pelas resinas para bases de próteses no metabolismo de lipídeos de células epiteliais orais. As resinas utilizadas foram: Lucitone 199 (termopolimerizável), Triad e Extoral (resinas do tipo dual). Foram confeccionados corpos-de-prova, na forma de discos, com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, de acordo com as instruções dos fabricantes e em condições assépticas. Células epiteliais orais de hamster foram propagadas em meio de cultura DMEM acrescido de 5% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 μl/ml de estreptomicina, incubadas a 37ºC com 5% de CO_2 no ar. Para a realização do ensaio experimental, primeiramente os corpos-de-prova foram mantidos em meio de cultura DMEM acrescido de antibióticos e sem soro fetal bovino por 24 ou 48 horas a 37ºC. Após esse período, o meio contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova foi colocado em placas contendo meio de cultura fresco acrescido de soro fetal bovino e células epiteliais orais de hamster.

Tais células propagadas em meio de cultura DMEM suplementado sem os discos de resina serviram como grupo controle. Após a realização de um teste para avaliar a síntese de lipídeos nas células epiteliais orais de hamster dos diferentes grupos testados, chegou-se a conclusão de que os componentes liberados pelas resinas para bases de próteses podem afetar o metabolismo de lipídeos e possibilitam alterações nas membranas celulares.

O efeito citotóxico de resinas acrílicas sobre fibroblastos gengivais foi verificado por Sheridan et al.[67], em 1997. Para este estudo, foram confeccionados corpos-de-prova, em condições assépticas, com as resinas Acron MC (resina ativada por microondas), resina para reparo Lucitone (ativada quimicamente) e Lucitone 199 (resina ativada pelo calor). Os corpos-de-prova, na forma de discos, apresentavam 12 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Segundo os autores, tal espessura corresponde a das próteses totais e parciais removíveis. Cada disco foi colocado dentro de uma placa e a ela foram adicionados 5 ml de meio de cultura α-MEM suplementado com 100 mg/ml de penicilina G, 50 mg/ml de sulfato de gentamicina e 0,1% de soro fetal bovino. Logo após a colocação do meio e após 24, 48, 72 e 96 horas, foram coletadas amostras contendo as substâncias liberadas pelos discos e nestas foi adicionada determinada concentração de fibroblastos gengivais cultivados previamente. Células

cultivadas em meio de cultura α-MEM serviram como grupo controle negativo. O teste de citotoxicidade utilizado foi o MTS, o qual avalia a quantidade de células metabolicamente viáveis por meio da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial em comparação com o grupo controle. Os resultados deste estudo demonstraram que, dentre as resinas, a que apresentou maior efeito citotóxico foi a quimicamente ativada (Lucitone reparadora). Nas primeiras 24 horas, a resina ativada por meio de microondas foi a que apresentou menor efeito citotóxico. Entretanto, após 48, 72 e 96 horas, ela passou a ter efeito intermediário em relação às demais resinas. Nestes períodos, a resina ativada pelo calor é que apresentou menor efeito sobre as células. O efeito citotóxico foi maior nas primeiras 24 horas e diminuiu ao longo do tempo para todas as resinas testadas. Com isso, concluiu-se que o armazenamento das próteses em água por longo período pode diminuir a citotoxicidade das substâncias liberadas e que as resinas acrílicas ativadas quimicamente são mais citotóxicas do que as outras.

Com o objetivo de verificar a concentração de monômero residual e de metacrilato de metila liberados por diferentes resinas acrílicas comercialmente disponíveis, assim como determinar a sua citotoxicidade, Kedjarune et al.[35], em 1999, realizaram um estudo utilizando três resinas

autopolimerizáveis (Takilon, Tokuso e Meliodent) e três termopolimerizáveis (Rodex, Trevalon e Meliodent). Para isso, 15 corpos-de-prova de cada material foram obtidos, de acordo com as instruções dos fabricantes, com 8 mm x 35 mm x 3 mm, tendo sido 10 utilizados para determinar a concentração de monômero residual imediatamente após a confecção e 5 colocados em tubos contendo saliva para análise do metacrilato de metila liberado pelo método da cromatografia à gás. Para o teste de citotoxicidade, meio de cultura contendo fibroblastos gengivais humanos foi misturado com soluções de metacrilato de metila em diferentes concentrações e a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio MTT. Os resultados mostraram que todas as resinas testadas apresentaram conteúdo de monômero residual e que sua quantidade não depende apenas do tipo de polimerização, mas também da proporção pó-líquido e do método de processamento. Quanto maior a quantidade de líquido adicionada à mistura, maior foi a quantidade de monômero residual. Além disso, quando o tempo de polimerização foi aumentado, a quantidade de monômero foi reduzida. Em relação ao teste de citotoxicidade, observou-se que quanto maior a concentração de metacrilato de metila na solução, maior é o seu efeito citotóxico. Outros estudos mostraram que para uma concentração de 10 μg/ml de células epiteliais ou leucócitos, o metacrilato de metila foi citotóxico após 1 minuto de incubação e, após 30 minutos, a maioria das células estava totalmente desintegrada.

Tang et al.[73], em 1999, compararam diferentes metodologias que avaliam a citotoxicidade dos materiais resinosos. Para isso, corpos-de-prova de alguns materiais resinosos foram confeccionados, de acordo com as instruções dos fabricantes, medindo 2 mm de espessura e 8 mm de diâmetro, os quais foram divididos em dois grupos: 1) corpos-de-prova com remoção da camada de inibição de oxigênio com acetona 99% e 2) corpos-de-prova sem remoção da camada de inibição de oxigênio. As amostras de cada grupo foram expostas a cultura de fibroblastos gengivais humanos por meio do contato direto (corpos-de-prova colocados sobre as células e células colocadas sobre os corpos-de-prova) ou por contato indireto (corpos-de-prova colocados sobre membranas contendo poros e células em contato com os extratos dos corpos-de-prova). Discos de vidro estéreis, com as mesmas dimensões das amostras em resina serviram como grupo controle negativo para cada grupo experimental acima descrito. Para a análise da citotoxicidade, três testes foram realizados após 1, 3 e 6 dias de exposição: teste MTT, que avalia a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial, teste do vermelho neutro, que avalia o número de células mortas e o teste que avalia a viabilidade celular pela síntese de DNA por meio da incorporação de um radioisótopo (^{3}H-timidina). Os autores observaram que o contato direto dos discos de vidro com os fibroblastos causaram inibição do crescimento em comparação com as células cultivadas em contato indireto,

tanto para o teste MTT como para o teste da incorporação de ^{3}H-timidina. Dessa forma, os autores concluíram que, apesar da necessidade do grupo controle, o contato direto dos discos de vidro com as células pode influenciar na viabilidade celular, não pela liberação de substâncias tóxicas, mas sim por fatores físicos. Além disso, os resultados mostraram que a remoção da camada de inibição de oxigênio dos corpos-de-prova reduziu a citotoxicidade dos materiais. O estudo mostrou, também, que o teste da incorporação de ^{3}H-timidina foi mais sensível do que o teste MTT. Assim, os autores concluíram que a utilização de diferentes métodos fornecem informações mais completas sobre a citotoxicidade dos materiais resinosos.

Wagner et al.[80], (1999) em seu estudo que comparou diferentes métodos para a análise da proliferação de linfócitos caninos, descreveram o teste MTT como sendo um método capaz de identificar a viabilidade celular por meio da enzima desidrogenase succínica, porém, não se mostrou preciso na identificação da proliferação de linfócitos caninos, sendo eficaz para isso, o teste da incorporação de ^{3}H-timidina. Além disso, os autores citaram algumas desvantagens do teste ^{3}H-timidina, como a necessidade de um equipamento especial de alto custo e a utilização de uma material radioativo e que, apesar disso, tal teste tem sido amplamente utilizado na determinação da proliferação celular.

Sabendo-se que a morte celular por apoptose é um processo ativo e fisiológico caracterizado por fragmentação nuclear, condensação da cromatina e preservação da integridade estrutural na ausência de reação inflamatória e que a morte celular por necrose é um processo degenerativo caracterizado pela ruptura da membrana plasmática e liberação das organelas na presença de reação inflamatória, Cimpan et al.[14], em 2000, realizaram um estudo com o objetivo de determinar a capacidade de indução de morte celular por necrose e/ou apoptose de alguns polímeros a base de polimetil metacrilato. Para isso, foram confeccionados corpos-de-prova com 50 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura, em condições assépticas e de acordo com as instruções dos fabricantes, das resinas para bases de próteses termopolimerizáveis Vertex RS, Superacryl e Superacryl New e das resinas acrílicas autopolimerizáveis Vertex SC, Quick SR, Duracryl e Duracryl New. Imediatamente após a confecção, os corpos-de-prova foram colocados em placas de Petri, de 60 mm de diâmetro, juntamente com meio de cultura Eagle e armazenados por 24 ou 48 horas a 37ºC para a obtenção de extratos. As médias entre massa de corpo-de-prova e volume de meio de cultura utilizado para a extração das substâncias possivelmente tóxicas foram de 0,2 g/ml, 0,4 g/ml e 0,8 g/ml. Meio de cultura Eagle, incubado sob as mesmas condições serviram como grupo controle negativo. Para os testes de citotoxicidade, células L 929 foram cultivadas em meio de cultura Eagle acrescido de antibióticos e soro fetal bovino. Os efeitos das substâncias

testadas foram avaliados por meio de microscopia eletrônica, contagem de colônias e verificação do comprometimento de DNA por meio do teste Annexin V-FITC, o qual determina o tipo de morte celular. Para a contagem de colônias, as células L 929 foram propagadas sobre os discos de resina imersos em meio de cultura Eagle, de acordo com as proporções entre massa e volume já mencionadas, ou em contato com os extratos previamente obtidos, tendo sido armazenadas por 10 dias. Para a realização do teste com Annexin V-FITC, as células L 929 foram propagadas em placas de 24 orifícios em contato com os extratos obtidos, coradas com o corante propidium iodide, o qual marca o DNA das células e armazenadas por 24 e 48 horas, possibilitando a verificação da redução do DNA das células mortas por apoptose. As células aderidas nos corpos-de-prova e as que cresceram em contato com os extratos obtidos foram fixadas para análise em microscopia eletrônica. Por meio da contagem de colônia, os resultados mostraram que quanto maior a média entre a massa do corpo-de-prova e o volume do meio, maior é a citotoxicidade do material testado, tendo sido as resinas autopolimerizáveis mais tóxicas dos que as termopolimerizáveis. A ordem dos materiais testados do mais tóxico para o menos tóxico verificada foi Duracryl > Duracryl New > Quick SR > Supracryl > Vertex SC > Supracryl New > Vertex RS. Além disso, observou-se que o contato direto entre as células e os discos de resina provoca maior redução do número de colônias. Na média de 0,8 g/ml, observou-se maior número de morte celular por

apoptose ou por necrose em relação às outras proporções utilizadas. Para todas as resinas acrílicas testadas e em todas as proporções utilizadas entre massa do corpo-de-prova e volume do meio foi verificado maior número de morte celular por apoptose em relação aos outros padrões, fato confirmado pela microscopia eletrônica. Os autores relataram a importância da verificação do padrão de morte celular, uma vez que a morte por necrose induz inflamação e injúrias no tecido. Dessa forma, uma reação mais severa do tecido pode ocorrer quando o material testado in vitro provocar morte celular por necrose.

Sendo a morte celular por apoptose ou necrose induzida pelo polimetil metacrilato um importante indicador do grau de citotoxicidade, Cimpan et al.[13], em 2000, realizaram um estudo com o objetivo de identificar e quantificar os modelos de morte celular induzida por substâncias liberadas por três resinas acrílicas termopolimerizáveis e quatro autopolimerizáveis. Os autores relataram que a morte celular por apoptose é fisiológica e ocorre na ausência de resposta inflamatória. É também caracterizada pela integridade das organelas celulares e da membrana plasmática. Já na morte celular por necrose, ocorre ruptura da membrana e liberação de seus constituintes, havendo, também, uma reação inflamatória no tecido. Para o estudo, foram confeccionados corpos-de-prova com 50 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura, de acordo com as instruções dos fabricantes, das resinas para

bases de próteses termopolimerizáveis Vertex RS, Superacryl e Superacryl New e das resinas acrílicas autopolimerizáveis Vertex SC, Quick SR, Duracryl e Duracryl New. Posteriormente, os corpos-de-prova foram armazenados por 24 ou 48 horas a 37ºC em meio de cultura RPMI para obtenção de extratos. As médias entre massa do corpo-de-prova e volume do meio utilizadas foram de 0,1 g/ml, 0,2 g/ml, 0,4 g/ml e 0,8 g/ml. Para que houvesse o contato dos extratos com as células, uma suspensão de 7,5 x 10^5 células U-937 (células de linfoma humano) foram colocadas em placas com 24 orifícios juntamente com 1,5 ml do meio de cultura contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova e armazenadas por 24 ou 48 horas. Uma cultura de células expostas a RPMI e armazenadas sob as mesmas condições dos extratos serviu como grupo controle. Após o período de armazenamento, três testes foram utilizados para a análise da citotoxicidade dos materiais: quantificação de DNA, microscopia óptica e eletrônica de transmissão e teste para quantificar a morte celular por apoptose ou necrose (teste Annexin V-FITC). Os resultados mostraram que as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova induziram, de forma significativa, a morte celular em relação ao grupo controle. Na concentração do extrato de 0,1 g/ml, as resinas autopolimerizáveis Duracryl e Duracryl New induziram alta porcentagem de morte celular por apoptose ou necrose em comparação às resinas termopolimerizáveis. Nas concentrações de 0,2 g/ml e 0,4 g/ml não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as

resinas. Na concentração de 0,8 g/ml, a morte por necrose superou a morte por apoptose das células em contato com os extratos das resinas Duracryl e Duracryl New. As substâncias liberadas por todas as resinas diminuíram a viabilidade das células em todos os intervalos de tempo utilizados, tendo sido observada maior morte celular quando em contato com extratos obtidos em 48 horas do que os obtidos em 24 horas. Por meio da microscopia, os autores puderam descrever as características morfológicas das células mortas por apoptose ou por necrose, confirmando a citotoxicidade dos materiais testados. Os autores consideraram a identificação do padrão de morte celular muito importante na verificação da citotoxicidade dos materiais testados, uma vez que, in vivo, a necrose causa reação inflamatória no tecido. Assim, concluiu-se que a morte celular por apoptose ou por necrose é reflexo da citotoxicidade de alguns materiais, indicando que os componentes liberados pelas resinas a base de polimetil metacrilato são citotóxicos.

Imazato et al.[27], em 2000, utilizaram o teste da incorporação do radioisótopo ^{3}H-timidina para a análise dos efeitos citotóxicos de alguns compósitos a base de monômeros mostrando, assim, a ampla utilização deste teste na determinação da proliferação celular. A incorporação da substância radioativa ao material genético ocorre apenas nas células que estão em proliferação. Dessa forma, uma inibição do crescimento pode ser verificada por meio da comparação com o grupo controle.

Costa[15], em 2001, descreveu uma metodologia de pesquisa para avaliação da citotoxicidade dos materiais odontológicos baseada na contagem de células, no metabolismo celular (teste MTT), na verificação do halo de inibição e na morfologia celular por meio da utilização da microscopia eletrônica de varredura. Sabendo-se que os testes de citotoxicidade podem ser divididos em iniciais, secundários e pré-clínicos, o autor destacou que os resultados dos testes iniciais apresentam limitações quanto a sua correlação direta com a situação clínica, porém são muito importantes porque fornecem um rápido e consistente resultado com relação a sua atividade biológica. Além disso, grupos controle negativos e positivos são fortemente recomendados para que se faça a comparação com os resultados dos materiais em teste, tendo sido classificados os materiais, de acordo com a sua citotoxicidade, em não tóxico, discretamente tóxico, tóxico e severamente tóxico. O autor relatou, ainda, algumas vantagens e desvantagens dos testes de citotoxicidade. Dentre as vantagens, a possibilidade de tornar a metodologia dos testes padronizados reproduzível em diversos laboratórios de diferentes países, permitindo a comparação dos resultados obtidos. Outra vantagem do teste de citotoxicidade in vitro, quando comparado às investigações in vivo, é que os testes laboratoriais possibilitam a obtenção de resultados mais confiáveis devido à rara possibilidade de interferências técnicas. Além disso, o autor destacou que, apesar dos resultados obtidos a partir de testes de citotoxicidade não

poderem ser de imediato extrapolados para as condições clínicas, foi relatado na literatura algum grau de correlação entre a citotoxicidade dos materiais in vitro e o efeito irritante in vivo, além de serem importantes para determinar o comportamento biológico dos materiais odontológicos.

Costa et al.[16], em 2001, em seu estudo que teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de soluções utilizadas para irrigação de polpas expostas, selecionou o teste MTT por apresentar uma estimativa global da viabilidade celular por meio da atividade da enzima desidrogenase succínica mitocondrial, tornando possível a análise da citotoxicidade dos materiais testados em comparação com grupos controle negativo e positivo.

Lefebvre et al.[47], em 2001, realizaram um estudo com o objetivo de determinar a efetividade da adição de um antifúngico, que contém triclosan (Microban), em um material para base de prótese (PermaSoft) na inibição do crescimento de *C. Albicans*, bem como o seu efeito citotóxico. Para isso, foram confeccionados corpos-de-prova de PermaSoft, de acordo com as instruções do fabricante, com 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, com ou sem Microban. Para determinar a citotoxicidade do material, uma suspensão de fibroblastos de hamster foi colocada em cada orifício de uma placa com 24 orifícios. Sobre as células, foram colocados os corpos-de-prova, com ou sem Microban, imediatamente após a confecção ou

após 5 dias de armazenamento em saliva artificial. As células foram, então, incubadas por 48 horas a 37º C em estufa contendo 5% de CO_2. Células cultivadas em meio de cultura, sem entrar em contato com os discos, serviram como grupo controle negativo. Após o período de incubação, a atividade da enzima desidrogenase succínica foi analisada por meio do teste MTT, determinando, dessa forma, a citotoxicidade de cada grupo experimental. Para a verificação do crescimento do fungo sobre a superfície dos corpos-de-prova, os mesmos foram contaminados com *C. Albicans* e a formação de colônias foi avaliada. Apesar do grupo controle apresentar maior densidade óptica e, portanto, maior número de células viáveis, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e controle, em relação à citotoxicidade do material testado.

Jorge et al.[32], em 2003, escreveram um artigo, revisando a literatura publicada entre os anos de 1973 e 2000, sobre a citotoxicidade de materiais para base de próteses comparando diferentes tipos de resinas, diferentes métodos e diferentes ciclos de polimerização. Em resumo, os autores relataram que as resinas autopolimerizáveis são mais citotóxicas do que as termopolimerizáveis que, por sua vez, são mais citotóxicas do que as polimerizadas por meio de microondas. Em relação ao ciclo de polimerização, os autores observaram nos estudos avaliados que a

quantidade de monômero residual, bem como a citotoxicidade, pode ser diminuída com o ciclo de 7 horas a 70ºC seguido de 1 hora a 100ºC. Além disso, os autores relataram que outros fatores podem influenciar na citotoxicidade desses materiais, como a proporção pó/líquido e o armazenamento das amostras em resina em água.

Com a proposta de comparar os efeitos de tratamentos térmicos na citotoxicidade de três resinas para bases de próteses Jorge et al.[33], em 2004, realizaram um estudo utilizando o teste de incorporação de ^{3}H-timidina e o teste MTT. Para a análise do efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos corpos-de-prova, foram obtidos extratos das substâncias hidrossolúveis dessas amostras. Para isso, três corpos-de-prova de cada grupo experimental, após terem recebido os tratamentos térmicos, foram colocados dentro de tubos de ensaio com 9 ml de meio de cultura Eagle e incubados a 37ºC por 24 horas. Durante esse período de incubação, as substâncias provavelmente tóxicas são difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos a serem utilizados nos testes de citotoxicidade. Um tubo de ensaio contendo apenas 9 ml de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo. Os resultados desse estudo mostraram que as substâncias liberadas das três resinas testadas foram mais citotóxicas para as células L 929 quando comparadas ao controle negativo no teste de incorporação de ^{3}H-timidina. Os

tratamentos térmicos não reduziram a citotoxicidade dos materiais avaliados. O teste de incorporação ^{3}H-timidina classificou os materiais como discretamente citotóxicos, e o MTT, como não citotóxicos sendo, portanto, considerado menos sensível.

No mesmo ano, Jorge et al.[31] realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de elucidar diferentes testes de citotoxicidade de alguns materiais dentários. Com isso, os autores concluíram que os testes de citotoxicidade utilizando o método da cultura de células são muito importantes, pois determinam o comportamento biológico dos materiais dentários e/ou de seus componentes e que os testes de citotoxicidade podem ser realizados utilizando-se várias metodologias, porém todas devem ser regulamentadas e padronizadas para serem reproduzidas em qualquer laboratório.

Uma vez que os monômeros residuais liberados por diferentes resinas são considerados potencialmente citotóxicos, Lai et al.[38], em 2004, realizaram um estudo objetivando verificar a citotoxicidade do líquido de uma resina acrílica autopolimerizável, utilizada para confecção de coroas provisórias e duas resinas acrílicas utilizadas para o reembasamento de base de próteses. Segundo os seus fabricantes, o monômero da resina Alike™ é o metil metacrilato, o da resina Kooliner é o isobutil metacrilato e o

da resina Tokuso Rebase é o 1,6-hexanodiol dimetacrilato. Para a análise da citotoxicidade, foram utilizados fibroblastos gengivais humanos e células do ligamento periodontal. Os resultados demonstraram que todos os monômeros foram citotóxicos para ambos os tipos de células e que o 1,6-hexanodiol dimetacrilato foi mais citotóxicos do que os outros líquidos testados. Os autores relataram que a citotoxicidade como fator primário da biocompatibilidade é geralmente determinada por testes in vitro com o uso de cultura de células. Em comparação com os testes in vivo, os testes in vitro são mais facilmente controlados, porém não podem ser quantitativamente correlacionados com as situações clínicas.

Apesar da comparação entre resultados de diferentes testes ser muito difícil em virtude das variações nas condições experimentais, tais como o tipo de célula utilizada, o tipo de contato e o tempo de exposição entre as células e o material testado, Nalçaci et al.[56], em 2004, realizaram um estudo com o objetivo de comparar a citotoxicidade de algumas resinas compostas em função do método de polimerização. Para o estudo, os autores obtiveram extratos dos materiais testados e realizaram o teste MTT para a análise da citotoxicidade utilizando as células L929. Os resultados mostraram que os diferentes métodos de polimerização não influenciaram a citotoxicidade das resinas compostas avaliadas.

Sabendo-se que a polimerização complementar em microondas ou em banho de água pode diminuir a quantidade de monômero residual e, portanto, diminuir a citotoxicidade das resinas acrílicas, Campanha et al.[12], em 2005, objetivaram avaliar o efeito da polimerização complementar em microondas ou em banho de água aquecida sobre a citotoxicidade de seis reembasadores diretos (Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel Hard, Duraliner, Kooliner, New Truliner e Light Liner). Para o desenvolvimento do estudo, corpos-de-prova das resinas acrílicas testadas foram confeccionados, na forma de disco, em condições assépticas e de acordo com as instruções dos fabricantes. Logo após a confecção, as amostras receberam tratamento em microondas, a seco, ou tratamento em banho de água aquecida. Em seguida, foram obtidos extratos dessas amostras para a realização dos testes de citotoxicidade. Os resultados mostraram que o teste de incorporação de ^{3}H-timidina foi mais sensível do que o teste MTT. Além disso, os autores verificaram que o tratamento em banho de água inibiu a proliferação celular para os materiais Tokuso Rebase Fast, New Truliner e Light Liner. Para o tratamento em microondas, houve também aumento da citotoxicidade dos materiais Kooliner, New Truliner e Light Liner. Os autores concluíram que, para o teste de incorporação do radioisótopo, a polimerização complementar em microondas ou em banho de água aquecida diminuiu a citotoxicidade da resina acrílica Ufi Gel Hard.

3 Proposição

A proposta do presente estudo foi avaliar, por meio do teste quantitativo de incorporação de ^{3}H-timidina, o efeito do tratamento térmico com microondas sobre a citotoxicidade de três resinas acrílicas termopolimerizáveis indicadas para confecção de bases de próteses, em função do tempo de armazenamento em água, e de três resinas acrílicas autopolimerizáveis indicadas para reembasamento.

4 Material e Método

4.1 Materiais

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

- água destilada
- aparelho termopolimerizador, Termotron Equip. Ltda
- balança de precisão Gehaka, Ind. e Com. Eletro – Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo – Brasil
- forno de microondas, Brastemp, Jet Defrost, Zona Franca de Manaus – Amazonas – Brasil
- gesso pedra tipo III, Herodent, Vigodent S.A. Ind. Comércio
- gral e espátula para gesso
- isolante para gesso, Cel - lac, SS White
- isolante para resina acrílica, Al - Cote, Dentsply Ltda

- matriz metálica, em forma de disco, com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura
- matriz metálica vazada com orifício de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura
- muflas metálicas nº 06 com parafusos DCL
- muflas plásticas para o uso em forno de microondas nº 06 com parafusos, GC Lab. Technologies Inc. – Japão
- placas de vidro
- prensa hidráulica, Delta Máquinas Especiais Ind. Bras.
- resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550, Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis - RJ - Brasil
- resina acrílica termopolimerizável QC 20, Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis - RJ - Brasil
- resina acrílica termopolimerizável Acron MC, GC Lab. Technologies Inc. – Japão
- resina acrílica para reembasamento de prótese Tokuyama Rebase II, Tokuyama Dental Corporation – Japão*

* A composição das resinas acrílicas utilizadas está descrita na tabela A1 do Apêndice A

- resina acrílica para reembasamento de prótese Kooliner, GC América Inc. – USA
- resina acrílica para reembasamento de prótese New Truliner, Bosworth Company - USA
- seringa plástica para elastômeros, Polidental, Ind. e Com. Ltda
- silicone de condensação, marca Optosyl, consistência densa, Haraeus Kulzer GmbH & Co.KG.
- silicone de condensação, marca Xantopren, consistência leve, Haraeus Kulzer GmbH & Co.KG.
- vaselina sólida, Sidepal

4.1.2 Aparelhos utilizados para esterilização dos corpos-de-prova

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

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

- aparelho Filtermate Harvester, Unifilter 96 GF/C – Packard Instrument Company, Meriden – CT - USA
- câmara hemocitométrica tipo Neubauer, Boeco, Hamburg - Alemanha
- capela de fluxo laminar, Veco do Brasil, Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Campinas – SP - Brasil
- centrífuga especial com suspensão auto balanceável, Fanem Ltda, São Paulo – SP - Brasil
- contador de cintilação, Packard Instrument Company, Meriden – CT - USA
- corante azul de Tripan, Merck - Indústrias Químicas Rio de janeiro – RJ – Brasil
- estufa para cultura de células, Forma Scientific, Marietta – OH - USA

- fibroblastos de hamster (células L929), Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP - Brasil
- frascos para cultura de células, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA
- líquido de cintilação Microscint 20, Packard Instrument Company, Meriden – CT - USA
- meio de cultura Eagle, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP – Brasil
- microscópio óptico, Nikon – modelo YS 100, Tokyo - Japão
- pipetas graduadas de 10 ml, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA
- pipetas graduadas de 5 ml, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA
- pipetador automático, Boeco, Hamburg - Alemanha
- placa para cultura de células com 96 orifícios, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA
- placas para contador de cintilação com 96 orifícios, Packard Instrument Company, Meriden – CT – USA
- radioisótopo ^{3}H-timidina, Amersham Pharmacia Biotech do Brasil Ltda, São Paulo – SP - Brasil

- raspadores de células, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA
- soro fetal bovino, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP - Brasil
- sulfato de gentamicina, Indústria Química e Farmacêutica, Schering – Plough S/A, Rio de Janeiro - RJ - Brasil
- tubos de ensaio, Costar, Corning Incorporated, Corning – NY - USA

4.2 Métodos

4.2.1 Confecção dos corpos-de-prova das resinas acrílicas termopolimerizáveis

Os corpos-de-prova das resinas acrílicas para base de próteses foram confeccionados, de maneira asséptica, para evitar a contaminação do meio de cultura, a partir de matrizes metálicas, em forma de discos com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, previamente esterilizadas (Figura 1).



FIGURA 1 - Matrizes metálicas

A partir dessas matrizes foram obtidos moldes com silicone de condensação, que foram recortados para posterior inclusão em mufla. Para isso, primeiramente, as matrizes foram colocadas sobre uma placa de vidro recoberta com papel celofane e, sobre elas, o material leve foi colocado com o auxílio de uma seringa para moldagem. Antes da presa desse material, o denso, já manipulado, foi acomodado e, então, outra placa de vidro recoberta com papel celofane foi posicionada. O conjunto foi levado à prensa hidráulica (Delta) até que as placas ficassem com um espaço de 10 mm entre elas, obtido pela colocação de espaçadores de metal. Após a presa do material, os excessos foram recortados para posterior inclusão em mufla, sendo descartados os que apresentavam irregularidades ou bolhas.

Para a inclusão dos moldes e das matrizes (ainda em posição), inicialmente, as muflas (metálicas e plásticas) foram isoladas com vaselina sólida e a parte inferior de cada uma delas foi preenchida com gesso pedra tipo III, na proporção de 30 ml de água para cada 100 gramas

de pó, espatulado por 40 segundos. Antes da presa do gesso, o molde recortado foi inserido sobre ele até alcançar o nível da parte inferior da mufla (Figura 2). Após a presa, todo o conjunto foi recoberto com uma fina camada de isolante para gesso aplicado com pincel macio. A seguir, uma placa de vidro medindo 4,0 cm X 4,0 cm X 0,5 cm foi posicionada sobre o molde, e a parte superior da mufla, adequadamente isolada com vaselina sólida, foi adaptada e preenchida com nova porção de gesso pedra tipo III proporcionada sob as mesmas condições descritas anteriormente.



FIGURA 2 - Inclusão dos moldes

Cada mufla foi fechada e levada à prensa hidráulica (DELTA) até que as partes se encontrassem e a pressão fosse estabilizada em meia tonelada. Os parafusos foram colocados em posição e o conjunto mantido até a presa final do gesso. Posteriormente, a mufla foi aberta para a retirada das matrizes metálicas. Obtiveram-se, dessa forma, os moldes de silicone incluídos em mufla para confecção dos corpos-de-prova.

Para a prensagem e polimerização das resinas, o molde de silicone e o gesso circundante foram isolados e, em seguida, cada amostra foi obtida com proporção e manipulação individual dos materiais de acordo com as recomendações dos fabricantes. Foram utilizadas as seguintes proporções: **Lucitone 550:** 0,42 grama de pó e 0,2 ml de líquido; **QC 20:** 0,46 grama de pó e 0,2 ml de líquido e **Acron MC:** 1,902 grama de pó e 0,9 ml de líquido. Na fase plástica, as resinas foram inseridas nos moldes de silicone até seu total preenchimento.

Posteriormente, as partes superiores e inferiores das muflas foram encaixadas e os conjuntos foram levados novamente à prensa hidráulica sob pressão de 1,25 tonelada e, assim, mantidos até que ocorresse a estabilização da pressão. Em seguida, os parafusos foram colocados em posição e as muflas foram retiradas da prensa. Após 30 minutos, as resinas foram submetidas aos seguintes ciclos de polimerização propostos pelos fabricantes:

Lucitone 550: a mufla foi imersa em água à temperatura de 73^0C, assim permanecendo por 90 minutos e, em seguida, a temperatura foi elevada para 100^0C e a mufla mantida por mais 30 minutos, utilizando-se um aparelho termopolimerizador.

QC 20: a mufla foi imersa em água em ebulição, o aquecimento foi mantido e a mufla permaneceu no recipiente por um período

de 20 minutos contados a partir do momento em que a água atingiu novamente a temperatura de ebulição.

Acron MC: a mufla para microondas foi levada ao forno de microondas durante 3 minutos à potência de 500 W.

Após a polimerização, cada mufla foi deixada sobre a bancada para resfriamento por 30 minutos e, em seguida, colocada em água corrente por 15 minutos, de acordo com as recomendações de cada fabricante. Então, suas partes foram separadas e as amostras desincluídas. Os excessos de resina foram recortados de cada corpo-de-prova com o auxílio de uma tesoura esterilizada (Figura 3).



FIGURA 3 - Corpos-de-prova em resina acrílica

4.2.2 Confecção dos corpos-de-prova das resinas para reembasamento

Os corpos-de-prova dessas resinas foram confeccionados, de maneira asséptica, a partir de matrizes metálicas vazadas, em forma de

discos contendo no seu interior um orifício medindo 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (Figura 4).

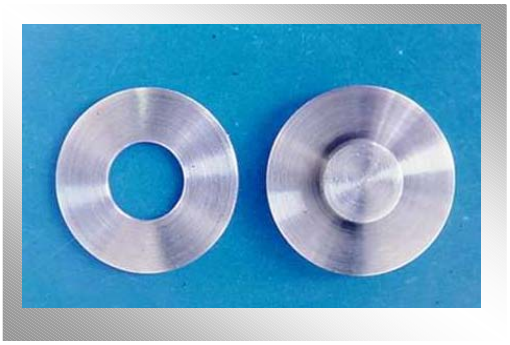


FIGURA 4 - Matriz metálica e êmbolo

Os materiais foram proporcionados e manipulados de acordo com instruções dos fabricantes. O pó foi proporcionado em balança de precisão em Dappens esterilizados que foram individualizados para cada material. O volume de monômero foi dispensado com o auxílio de pipetas de vidro graduadas, tomando-se cuidado de se usar pipetas diferentes para cada material, tendo em vista que a citotoxicidade das resinas acrílicas está relacionada com cada tipo de monômero. Para a resina **Tokuyama Rebase II**, foram proporcionados 2,13 gramas de pó para 1,5 ml de líquido. Para o reembasador **Kooliner**, a proporção foi de 2,1 gramas de pó para 1,5 ml de líquido. Já para a resina **New Truliner** foi proporcionado 1,34 grama de pó para 1 ml de líquido. Após a mistura, os frascos permaneceram tampados até que a polimerização da resina atingisse a fase plástica. Neste momento, os

materiais foram inseridos nas matrizes vazadas e prensados manualmente entre duas placas de vidro esterilizadas com duas folhas de acetato, também esterilizadas, interpostas até o término da polimerização. Para a remoção das amostras, o êmbolo foi posicionado na matriz de forma a deslocar o corpo-de-prova. Finalmente, o excesso de material de cada amostra foi recortado com tesoura esterilizada.

4.2.3 Armazenamento em água

Logo após a confecção, os corpos-de-prova das três resinas acrílicas termopolimerizáveis foram armazenados em invólucros plásticos estéreis, hermeticamente fechados contendo água destilada estéril, em estufa para cultura de células a 37ºC durante 0, 24 ou 48 horas para a análise do efeito do armazenamento em água sobre a citotoxicidade das resinas acrílicas termopolimerizáveis. As amostras das resinas para reembasamento não foram armazenadas, uma vez que clinicamente isso não é usual, tendo sido avaliadas somente logo após a polimerização (tempo 0).

4.2.4 Tratamentos térmicos

Após cada período, os corpos-de-prova de cada resina para base e reembasamento de próteses foram divididos em grupos de acordo com o tipo de tratamento térmico a que foram submetidos.

Grupo 1: os corpos-de-prova não receberam nenhum tipo de tratamento térmico (ST).

Grupo 2: os corpos-de-prova, individualmente, foram expostos, em 200 ml de água destilada, à energia de microondas sob potência de 500 W por 3 minutos[26,36] (MC).

Para o teste de citotoxicidade, foram destinados três corpos-de-prova de cada condição experimental, tendo sido, dessa forma, confeccionadas dezoito amostras de cada resina acrílica para base e seis amostras de cada resina acrílica para reembasamento.

4.2.5 Esterilização dos corpos-de-prova

Os corpos-de-prova foram confeccionados dentro de condições assépticas para evitar a contaminação do meio de cultura. Assim, um único operador, atuando sobre uma superfície de papel estéril, confeccionou os corpos-de-prova utilizando instrumental esterilizado, roupas

de proteção, luvas, óculos e máscaras descartáveis. Após terem sido armazenados e tratados termicamente, anteriormente à sua colocação no meio de cultura para a obtenção dos extratos, os corpos-de-prova foram colocados em sacos plásticos estéreis hermeticamente fechados e receberam banho de ultra-som por 20 minutos. Em seguida, ficaram expostos à luz ultravioleta na capela de fluxo laminar por mais 20 minutos para cada lado do corpo-de-prova com o objetivo de eliminar os possíveis microorganismos remanescentes[67].

4.2.6 Obtenção dos extratos

Para a análise do efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos corpos-de-prova, foram obtidos extratos das substâncias hidrossolúveis dessas amostras[28,46,65,67,82]. Para isso, três corpos-de-prova de cada grupo experimental, após terem recebido o tratamento térmico, foram colocados dentro de tubos de ensaio com 9 ml de meio de cultura Eagle, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 μg/ml de gentamicina, e incubados a 37ºC por 24 horas (Figura 5). Durante esse período de incubação, as substâncias provavelmente tóxicas foram difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos que serão utilizados no teste de citotoxicidade.

Um tubo de ensaio contendo apenas 9 ml de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo.



FIGURA 5 - Confecção dos extratos

4.2.7 Cultura e manutenção das células

O possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelas resinas foi avaliado pelo método de cultura de células. Dessa forma, fibroblastos de hamster (L929) [15,28] foram propagados em meio de cultura de Eagle suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 μg/ml de gentamicina. O cultivo das células foi realizado em frascos para culturas de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO_2. Esses frascos foram incubados em estufa para cultura de células com 5% de CO_2, à temperatura de 37^0C e ambiente com umidade controlada.

Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novos frascos após períodos de 3 dias de incubação, até que se procedesse o teste de citotoxicidade. Para isso, foram utilizados raspadores de células com a finalidade de desagregar as células da parede do fundo do frasco e obter uma suspensão. Dessa suspensão de células, cada 1 ml foi colocado em novo frasco, sendo acrescidos 9 ml de meio de cultura suplementado, com o auxílio de uma pipeta graduada e um pipetador automático. Cada frasco foi, então, tampado e levado à estufa para a formação de nova confluência de células.

É importante salientar que todos os procedimentos foram realizados em área asséptica da chama do Bico de Bunsen dentro da capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70%. Além disso, os materiais utilizados, com exceção das células, foram esterilizados previamente em luz ultravioleta durante 20 minutos dentro da capela de fluxo laminar (Figura 6).



FIGURA 6 - Capela de fluxo laminar

4.2.8 Quantificação das células

Para a realização dos testes de citotoxicidade, uma suspensão de 1,0 x 10^5 células/ml de meio de cultura foi preparada. Para isso, as células foram descoladas do fundo da garrafa por meio de um raspador de células. Em seguida, essa suspensão foi colocada em um tubo de 15 ml e levada para uma centrífuga especial autobalanceável (Figura 7), por 5 minutos a 1.500 rpm, com o objetivo de precipitar as células no fundo do tubo. Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1 ml de meio de cultura Eagle, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 μg/ml de gentamicina, foi acrescentado e as células misturadas a ele. A partir daí, 10 μl foram retirados e adicionados a 90 μl de corante azul de Tripan. Dessa solução, 10 μl foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Figura 8) onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico (Figura 9) com aumento de 40x. Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de 1,0 x 10^5 células/ml de meio de cultura para posterior utilização no teste de citotoxicidade, variando-se apenas o volume da suspensão.

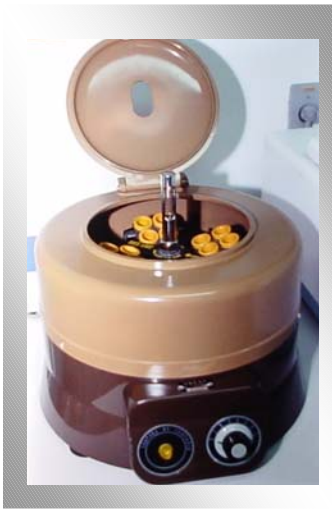


FIGURA 7 – Centrífuga



FIGURA 8 - Câmara hemocitométrica



FIGURA 9 - Microscópio óptico

4.2.9 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade dos materiais foi analisada quantitativamente por meio da incorporação do radioisótopo ^{3}H – timidina, verificando o número de células viáveis pela síntese de DNA.

Para a realização do teste, 100 μl da suspensão contendo 1,0 x 10^5 células/ml, ou seja, 1,0 x 10^4 células/ml, foram colocados em cada compartimento de uma placa com 96 orifícios (Figura 10) e incubada em estufa com 5% de CO_2, a 37ºC por 24 horas. Após este período, o meio de cultura que alimentava as células foi descartado e 20 μl de meio de cultura Eagle contendo 0,25 μCi de ^3H – timidina foi inserido em cada orifício da placa juntamente com 50 μl de meio de cultura novo e 50 μl do extrato contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova e incubada por 24 horas em estufa com 5% de CO_2 à temperatura de 37ºC. Para cada grupo experimental, foram destinados seis compartimentos da placa. Seis orifícios da placa contendo as células aderidas receberam apenas a solução de timidina e 100 μl de meio de cultura Eagle novo, servindo, dessa forma, como grupo controle negativo. Após o período de 24 horas em contato com os extratos, o meio foi descartado e, em cada orifício da placa, foram colocados 50 μl de tripsina, sendo esta armazenada por 5 minutos na estufa a 37ºC para que as células se desprendessem do fundo do compartimento e ficassem em suspensão. Em seguida, a placa foi levada para o aparelho Filtermate Harvester (Figura 11), onde o sobrenadante foi desprezado e as células marcadas com material radioativo foram aspiradas, ficando presas em filtros de outra placa de 96 orifícios branca (Figura 12). Após um período de 24 horas, a placa foi vedada com um selador opaco na sua parte inferior

e, então, 30 µl de líquido de cintilação (Microscint 20) foram colocados em cada orifício. Posteriormente, um selador transparente foi colocado na parte superior da placa, levada para análise da síntese de DNA em um contador de cintilação (Figura 13). Através da vibração do líquido de cintilação, a qual ocorre devido à síntese de DNA, é que o contador de cintilação realiza a leitura do número de células viáveis em cintilações por minuto (cpm).



FIGURA 10 - Placa de 96 orifícios



FIGURA 11 - Harvester



FIGURA 12 - Placa branca



FIGURA 13 - Contador de cintilação

4.3 Metodologia estatística

Os resultados da síntese de DNA (^{3}H – timidina), em cintilações por minuto (cpm), foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial incompleto de três fatores (tratamento térmico; material e tempo de armazenamento em água), incluindo ainda um grupo controle, ao nível de 5% de significância.

O fator tratamento térmico possui dois níveis, que são as condições de realização do tratamento: sem tratamento (ST) e tratamento em microondas com o corpo-de-prova imerso em água (MC); o fator material possui seis níveis, compreendendo as resinas: Acron MC, Lucitone 550, QC 20, New Truliner, Kooliner e Tokuyama Rebase, enquanto o fator tempo de armazenamento possui três níveis, em horas: 0, 24 e 48. O tempo de armazenamento só foi utilizado para as três primeiras resinas, tornando o fatorial incompleto, com um total de vinte e cinco grupos experimentais para análise. Ao grupo controle negativo se supõe corresponder o índice de citotoxicidade mínima. A análise de variância foi complementada pelo teste de Tukey, também ao nível de 5% de significância.

A validade da análise de variância depende da homogeneidade de variâncias e da normalidade dos resíduos. A homogeneidade de variância se refere à igualdade das variâncias nos

diversos grupos experimentais em análise, enquanto que os resíduos são determinados pela diferença entre os valores experimentais e a média do grupo ao qual pertencem. A homogeneidade de variâncias foi testada pelo procedimento de Levene e a normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, ambos ao nível de 5% de significância.

Após a avaliação estatística, comparando-se com o controle os resultados da incorporação de ^{3}H-timidina, os materiais foram classificados de acordo com o efeito citotóxico em: não-citotóxico (viabilidade celular acima de 75% em relação ao grupo controle), discretamente citotóxico (viabilidade celular entre 50 e 75% em relação ao grupo controle), moderadamente citotóxico (viabilidade celular entre 25 e 50% em relação ao grupo controle) e intensamente citotóxico (viabilidade celular abaixo de 25% em relação ao grupo controle)[15,28,61].

5 Resultados

Os valores de contagens das células viáveis, em cintilações por minuto (cpm), obtidos pela incorporação da substância radioativa ^{3}H – timidina para a avaliação da citotoxicidade das resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses, em função de tratamento térmico e do tempo de armazenamento em água, estão expostos na Tabela A2 do Apêndice A.

O sumário da análise de variância para a avaliação das médias de contagens de células viáveis é dado na Tabela A3 do Apêndice A. Esta tabela inclui os valores de *p* para verificar a homogeneidade de variância e normalidade dos resíduos, os quais podem ser aceitos, pois *p* é maior que 0,05 em ambos os casos. A interação tripla é significativa ($p<0,001$), indicando certa complexidade na comparação das médias. O teste de Tukey foi empregado para a comparação das médias duas a duas e o resultado está resumido na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias e desvios padrão (DP) de contagem de células incorporadas pela timidina

Trat.	Mat.	Tempo de armazenamento (h)								
		0			24			48		
		Média	DP		Média	DP		Média	DP	
ST	A	15661,7	861,9	$^{A}_{a}$	24584,7	1677,6	$^{AB}_{c}$	19375,5	1516,6	$^{A}_{b}$
	L	23412,2	1943,9	$^{C}_{a}$	24418,3	1704,3	$^{AB}_{a}$	25177,7	1441,0	$^{C}_{a}$
	QC	22754,0	1761,7	$^{BC}_{a}$	22973,2	1297,4	$^{A}_{a}$	19990,2	732,3	$^{A}_{a}$
	NT	23429,5	732,0	^{C}						
	K	24704,0	957,9	^{CD}						
	T	14859,7	504,0	^{A}						
MC	A	12903,0	1839,9	$^{A}_{a}$	24576,7	1480,1	$^{AB}_{c}$	21467,3	1169,5	$^{AB}_{b}$
	L	24899,7	792,0	$^{CD}_{a}$	23813,3	1112,2	$^{AB}_{a}$	24180,8	1373,8	$^{BC}_{a}$
	QC	20057,5	1523,9	$^{B}_{a}$	24821,3	1047,0	$^{AB}_{b}$	19465,5	1549,0	$^{A}_{a}$
	NT	23458,3	908,8	^{C}						
	K	23974,7	1678,9	^{CD}						
	T	20254,7	1453,1	^{B}						
	Ctr	26705,2	2104,9	^{D}			^{B}			^{C}

No sentido vertical, médias com letras maiúsculas iguais não têm diferença significativa ao nível de 5%

No sentido horizontal, médias com letras minúsculas iguais não têm diferença significativa ao nível de 5%

Na Tabela 1 são dadas as médias e os desvios padrão de contagens de células de todos os grupos experimentais. Nesta tabela está resumido o resultado da aplicação do teste de Tukey para a comparação múltipla de médias, ao nível de 5% de significância, da seguinte forma: no sentido vertical, médias com letras maiúsculas iguais não têm diferença significativa, enquanto que, no sentido horizontal, médias com letras minúsculas iguais não têm diferença significativa. Os resultados podem ser visualizados na Figura 14, onde estão representadas graficamente as médias acompanhadas por intervalos de 95% de confiança. Quanto maior a sobreposição dos intervalos, menor a evidência de diferença entre as médias.

Na Figura 15 estão representadas as médias de citotoxicidade em relação ao controle. O traço vertical representa um intervalo de 95% de confiança para a média populacional de citotoxicidade. Após a avaliação estatística, comparando-se com o controle os resultados da incorporação de ^{3}H-timidina, os materiais foram classificados de acordo com o efeito citotóxico em: não-citotóxico (viabilidade celular acima de 75% em relação ao grupo controle), discretamente citotóxico (viabilidade celular entre 50 e 75% em relação ao grupo controle), moderadamente citotóxico (viabilidade celular entre 25 e 50% em relação ao grupo controle) e intensamente citotóxico (viabilidade celular abaixo de 25% em relação ao grupo controle)[28,33,73].

Assim, considerando-se cada material isoladamente, a polimerização complementar em microondas só teve efeito para o Tokuyama, aumentando significativamente a média do número de células viáveis e, portanto, diminuindo sua citotoxicidade. Esse material, quando não submetido ao tratamento com microondas, apresentou média entre as menores, ficando equivalente às médias da resina Acron MC com ou sem tratamento e sem armazenamento em água (0h). Nesses três casos a viabilidade celular ficou entre 50 e 75% em relação ao controle, porém mais próximas de 50%, tendo sido os materiais classificados como discretamente citotóxicos. Ainda sem armazenamento em água, e independentemente do tratamento, os outros materiais apresentaram médias de contagem de células em cintilações por minuto praticamente equivalentes. A viabilidade celular ficou acima de 75% em relação ao grupo controle, ainda que para a resina QC 20 a viabilidade celular tenha ficado mais próxima do limite de 75%. Assim, nesses casos, os materiais foram classificados como não-citotóxicos.

Após 24 horas de armazenamento em água não se observou diferença significativa entre as médias de contagem de células em cintilações por minuto para os três materiais analisados, independentemente do tratamento. A viabilidade celular ficou acima de 75% em relação ao controle e, dessa forma, os materiais também foram classificados como não-citotóxicos.

Após 48 horas de armazenamento em água, as médias de contagem de células em cintilações por minuto da resina Lucitone 550 se mantiveram inalteradas. Entretanto, as médias relativas às resinas Acron MC e QC 20 diminuíram significativamente. Para a resina Acron MC sem tratamento e para a resina QC 20 com ou sem tratamento, a viabilidade celular ficou em torno dos 75% em relação ao controle. Dessa forma, esses materiais foram classificados como discretamente citotóxicos. Apesar de ter havido diminuição significativa da viabilidade celular para as amostras da resina Acron MC imersas em água após 48 horas de armazenamento e submetidas à polimerização complementar em microondas, estas continuaram sendo classificadas como não-citotóxica.

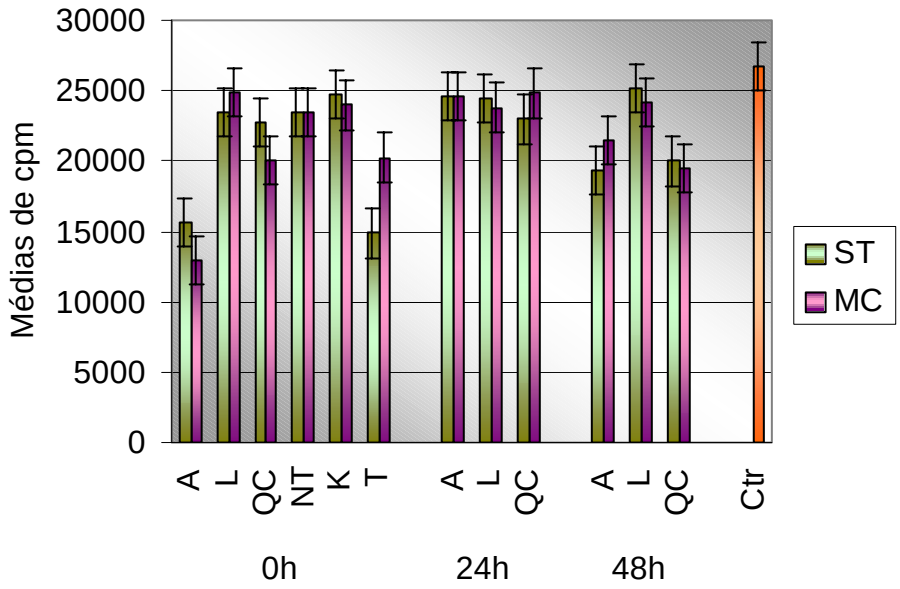


FIGURA 14 - Representação gráfica de médias de contagens de células obtidas pela incorporação da timidina. O traço vertical representa um intervalo de 95% de confiança para a média populacional

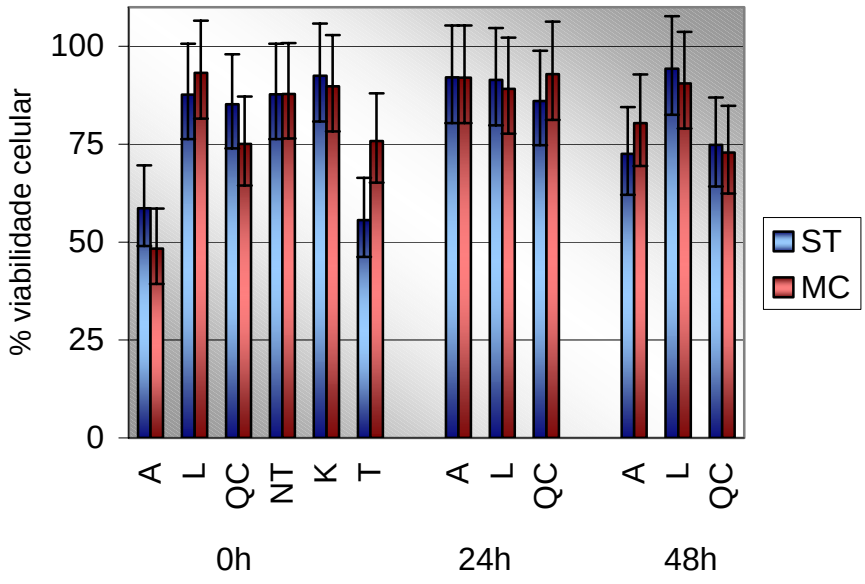


FIGURA 15 – Médias de citotoxicidade em relação ao controle. O traço vertical representa um intervalo de 95% de confiança para a média populacional (citotoxicidade: 0-25% intensa; 25-50% moderada; 50-75% discreta e 75-100% nula)

6 Discussão

Os testes de citotoxicidade, quando adequadamente padronizados, o que é absolutamente necessário, são muito importantes pois determinam o comportamento biológico dos materiais e/ou de seus componentes, fornecendo um rápido e consistente resultado com relação a sua atividade biológica.

O teste de citotoxicidade por meio da incorporação de ^{3}H-timidina é um teste quantitativo e tem sido amplamente utilizado apesar de possuir algumas desvantagens, como a necessidade de um equipamento especial de alto custo e a utilização de um material radioativo[78,80]. A incorporação do radioisótopo ^{3}H-timidina ao material genético ocorre apenas nas células que estão em proliferação. Sendo assim, por meio da análise da síntese de DNA, uma inibição do crescimento causada pelo contato das células com as prováveis substâncias citotóxicas é verificada pela comparação com o grupo controle[27,80].

Estudos anteriores[12,33,73] demonstraram que o teste de incorporação de ^{3}H-timidina é mais sensível do que o teste MTT (que avalia a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial) na determinação da citotoxicidade dos materiais odontológicos, justificando a escolha desse teste no presente estudo.

A proposta do presente estudo foi avaliar, por meio do teste quantitativo de incorporação de ^{3}H-timidina, o efeito do tratamento

térmico em microondas, com as amostras imersas em água, sobre a citotoxicidade de três resinas acrílicas autopolimerizáveis indicadas para o reembasamento e de três resinas acrílicas termopolimerizáveis indicadas para confecção de bases de próteses, em função do tempo de armazenamento em água.

Pela análise da Figura 15, observa-se que o tratamento térmico realizado influenciou a citotoxicidade do reembasador Tokuyama Rebase II. Para esse material, a irradiação em microondas por 3 minutos, utilizando-se a potência de 500 W, proporcionou aumento significativo da média do número de células em cintilações por minuto e, portanto, diminuiu a sua citotoxicidade. A Figura 16 demonstra que as amostras dessa resina sem o tratamento térmico foram graduadas como discretamente citotóxicas e, após o tratamento, foram classificadas como não-citotóxicas. O método de irradiação por microondas, também denominado aquecimento dielétrico, provavelmente proporcionou aquecimento imediato e uniforme da resina tanto nas camadas superficiais como naquelas mais profundas.[57] Assim, a irradiação das microondas pode ter aumentado o grau de conversão do monômero dessa resina autopolimerizável e, dessa forma, melhorado suas propriedades[10,85]. Pode-se supor que, após o reembasador Tokuyama Rebase II ter sido polimerizado, as moléculas de monômero residual retidas no interior do polímero absorveram energia suficiente para permitir o seu deslocamento em direção aos radicais livres presentes,

favorecendo a polimerização complementar. Além disso, outro fator que pode ter influenciado na diminuição da citotoxicidade dessa resina é a difusão das moléculas de monômero em água aquecida durante o tratamento térmico, em concordância com os estudos citados anteriormente.

Por outro lado, para todos os outros materiais, o tratamento térmico em microondas não produziu efeito significativo sobre a citotoxicidade. A diferença de comportamento em relação à citotoxicidade das resinas avaliadas neste estudo pode ser atribuída às diferenças de composição química. Arima et al.[4] observaram relação direta entre a composição química do material e suas propriedades. Sabe-se que a citotoxicidade de um material está diretamente relacionada com sua composição química e com a metodologia empregada na avaliação. No que se refere aos materiais reembasadores, sua formulação é disponibilizada comercialmente na forma de pó, à base de polietilmetacrilato, e líquido, que pode ser constituído de monômeros tais como butilmetacrilato, isobutilmetacrilato, 2-hidroxietilmetacrilato, β-metacriloil oxietil propionato e 1,6 hexaenediol dimetacrilato. Além disso, esses materiais apresentam em suas composições agentes plastificantes e iniciadores, que são os fitalatos e o peróxido de benzoíla, adicionados ao polímero e apresentam ainda, em sua composição, um ativador, que é geralmente uma amina terciária, uma vez que eles não são termoativados.

Os materiais Kooliner e New Truliner apresentam na sua composição o monômero isobutil metacrilato. Já o reembasador Tokuyama Rebase II é composto pelo monômero 2-acetoacetoxietil metacrilato, fato que pode explicar as diferenças encontradas neste estudo.

Outro fator influente na quantidade de monômero residual e, conseqüentemente, na citotoxicidade das resinas acrílicas é o tipo de polimerização[32]. De acordo com Hensten-Pettersen e Wictorin[25], a citotoxicidade é maior nas resinas autopolimerizáveis do que nas termopolimerizáveis. O efeito citotóxico das resinas termopolimerizáveis, autopolimerizáveis ou polimerizadas por meio da energia de microondas sobre os fibroblastos gengivais humanos foi reportado por Sheridan et al.[67], que verificaram terem as resinas autopolimerizáveis apresentado-se mais citotóxicas do que as demais resinas acrílicas. Tsuchiya et al.[76] e Cimpam et al.[13,14] revelaram que as resinas autopolimerizáveis liberaram uma quantidade consideravelmente maior de substâncias do que as resinas termopolimerizáveis ou polimerizadas por meio de microondas.

Nas resinas para base de prótese termicamente polimerizáveis, após a adição do monômero, a ativação do iniciador peróxido de benzoíla é obtida por meio de calor, formando radicais livres que dão início à reação de polimerização[29]. Nas resinas autopolimerizáveis, o peróxido de benzoíla é ativado quimicamente, permitindo que a reação ocorra à temperatura ambiente. Neste caso, uma

pequena quantidade de amina terciária (dimetil - p – toluidina) adicionada ao monômero reage com o peróxido de benzoíla, formando os radicais livres e dá início à reação de polimerização. Durante a reação de polimerização, à medida que a quantidade de monômero é reduzida, o calor disponível se estabiliza, tornando mais difícil a aproximação entre as moléculas de monômero remanescentes e os radicais livres. Como conseqüência, parte do monômero fica retida no interior do material, mesmo após vários anos de utilização das próteses[63].

O processo de polimerização por meio de microondas foi observado por De Clerck[19]. O autor considerou que as microondas são ondas eletromagnéticas que podem ser utilizadas para gerar calor no interior das resinas acrílicas, iniciando o processo de polimerização. Observou que a quantidade de monômero residual foi menor com a polimerização pelas microondas quando comparada com o método convencional. O ciclo de polimerização de 500 W por 3 minutos utilizado para a polimerização da resina Acron MC foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Segundo Ilbay et al.[26], essa recomendação do ciclo de polimerização de 3 minutos a 550 W de potência propicia condições em que não ocorrem variações relevantes nas propriedades das resinas.

Contradizendo os achados citados anteriormente[19,63], os resultados deste estudo mostraram que algumas resinas acrílicas termopolimerizáveis para bases foram mais citotóxicas do que algumas

resinas acrílicas autopolimerizáveis para reembasamento de próteses. Assim, no tempo 0 (Figura 15), quando foram comparadas as seis resinas acrílicas, para as amostras da resina Acron MC com ou sem tratamento complementar em microondas uma maior citotoxicidade foi observada, equivalente à das amostras de resina Tokuyama Rebase II sem tratamento. Para esses grupos experimentais, as resinas foram consideradas discretamente citotóxicas. As demais resinas acrílicas para ambos os grupos, com ou sem tratamento, foram consideradas não-citotóxicas.

A discreta citotoxicidade da resina Acron MC no tempo 0 pode ser explicada pela liberação de seus componentes durante a confecção dos extratos. Uma vez que a polimerização das amostras ocorreu a seco, parte dessas substâncias deve ter sido deslocada do interior da massa para as camadas mais externas durante a polimerização. Essas substâncias foram, então, difundidas no meio de cultura durante as 24 horas de permanência no meio para confecção dos extratos.

Além disso, estudos sugerem que diferentes ciclos de polimerização podem resultar em diferentes quantidades de monômero residual[20,79]. Neste estudo utilizou-se um dos ciclos propostos pelo fabricante da resina acrílica Lucitone 550, durante o qual a mufla foi imersa em água à temperatura de 73^0C, onde permaneceu por 90 minutos, em seguida elevada para 100^0C, temperatura na qual a mufla foi

mantida por mais 30 minutos, ciclo que se aproxima do recomendado por Anusavice[3]. Segundo esse autor, o aquecimento das resinas termopolimerizáveis em temperaturas acima de 60ºC faz com que as moléculas de peróxido de benzoíla entrem em decomposição, formando os radicais livres. Em seguida, cada radical reage com uma molécula de monômero disponível, iniciando o processo de polimerização. Nesse caso, o calor é o ativador da reação, e o peróxido de benzoíla, o iniciador. Além disso, ressaltou que dois ciclos de termopolimerização têm sido utilizados com sucesso: 1) processamento em banho de água quente com temperatura constante de 74ºC por 8 horas e 2) processamento a 74ºC por 2 horas seguido por mais uma hora a 100ºC. Segundo Harrison e Huggett[23], o ciclo de 7 horas em água a 70ºC associado a um aquecimento final por 1 hora a 100ºC é ideal, pois resulta em máxima conversão do monômero em polímero. McCabe e Basker[52] verificaram que níveis mais baixos de monômero residual foram encontrados nos ciclos longos (7 horas a 70^0C, seguido por 3 horas a 100^0C) e níveis intermediários no ciclo rápido em água (20 minutos). Realizando uma correlação com estudos que avaliaram a quantidade de monômero residual, resultados similares foram encontrados por Blagojevic e Murphy[10], que verificaram que o ciclo longo de polimerização em banho de água quente por 14 horas, a 70ºC, seguido por mais 3 horas em água em ebulição diminuiu a quantidade de monômero residual para os três materiais quando comparado à polimerização por meio de microondas,

principalmente em virtude da polimerização final por 3 horas na água em ebulição. Assim, o ciclo de polimerização utilizado para a resina acrílica Lucitone 550, o qual inclui a polimerização a 100ºC por 30 minutos, poderia explicar a ausência de citotoxicidade.

Em relação à resina QC 20, o ciclo selecionado para este estudo foi o ciclo curto recomendado pelo fabricante, durante o qual a mufla foi imersa em água em ebulição, o aquecimento foi mantido e a mufla permaneceu no recipiente por um período de 20 minutos contados a partir do momento em que a água atingiu novamente a temperatura de ebulição. Segundo Harrison e Huggett[23], o ciclo curto de polimerização proporciona maior quantidade de monômero residual em relação a outros ciclos. Além disso, segundo Austin e Basker[5], as resinas para bases de próteses polimerizadas por meio de ciclos curtos (menos do que 2 horas) promovem cerca de sete vezes mais concentração de monômero residual do que aquelas polimerizadas por ciclos longos (mais do que 6 horas). Entretanto, surpreendentemente, a resina QC 20 não se mostrou citotóxica.

A literatura revisada apontou a importância do armazenamento em água para a diminuição da citotoxicidade das resinas acrílicas para bases de próteses. Jorge et al.[33] realizaram um estudo com a proposta de comparar os efeitos de tratamentos térmicos em microondas ou em banho de água aquecida sobre a citotoxicidade de três resinas para bases de próteses após armazenamento das amostras por

48 horas. Os resultados do referido estudo mostraram que todas as resinas foram discretamente citotóxicas mesmo após o armazenamento e que os tratamentos térmicos não reduziram a citotoxicidade dos materiais avaliados. Os autores sugeriram que o armazenamento em água das amostras por 48 horas poderia reduzir a quantidade de monômero residual, inibindo o efeito dos tratamentos térmicos na complementação da polimerização. Porém, outras substâncias tóxicas não foram liberadas durante o armazenamento, contribuindo para esses resultados.

Assim, outra proposta do presente estudo foi comparar a citotoxicidade das resinas acrílicas para base de próteses de acordo com o tempo de armazenamento em água, nos tempos 0, 24 e 48 horas.

Após 24 horas de armazenamento em água, não se observou diferença significativa entre as médias de contagem de células em cintilações por minuto para os três materiais analisados, independentemente dos grupos experimentais. A viabilidade celular ficou acima de 75% em relação ao controle e, dessa forma, os materiais também foram classificados como não-citotóxicos. É importante observar que, para a resina Acron MC, o armazenamento proporcionou um aumento do número de células, diminuindo a sua citotoxicidade. De acordo com a Figura 16, no tempo 0, essa resina com ou sem tratamento foi classificada como discretamente citotóxica. Após 24 horas de armazenamento em água, essa resina foi graduada como não-citotóxica, mantendo essa classificação após as 48 horas de armazenamento.

Vários estudos mostram que a maior liberação de monômero residual ocorre nas primeiras 24 horas[11,43,48,53,59,67,72] e, sendo assim, grande parte do monômero residual encontrado entre as cadeias poliméricas se difundem em água[40]. Tsuchiya et al.[75] observaram que, após um dia de imersão em meio aquoso, a liberação de formaldeído pelas resinas acrílicas para bases de próteses foi reduzida pela metade. Essas considerações poderiam explicar esses resultados.

Entretanto, quando se analisa os resultados encontrados após 48 horas de armazenamento em água, as médias relativas às resinas Acron MC e QC 20 diminuíram significativamente. Para a resina Acron MC sem tratamento e para a resina QC 20 com ou sem tratamento, a viabilidade celular ficou em torno dos 75% em relação ao controle. Dessa forma, esses materiais foram classificados como discretamente citotóxicos. Apesar de ter havido diminuição significativa da viabilidade celular para as amostras da resina Acron MC submetidas à polimerização complementar em microondas, elas continuaram sendo classificadas como não-citotóxicas após esse tempo de armazenamento.

Os mesmos resultados foram encontrados por Jorge et al.[33], que classificaram as resinas Acron MC e QC 20 com ou sem tratamento térmico como discretamente citotóxicas, quando analisadas pelo teste de incorporação de ^{3}H-timidina após 48 horas de armazenamento em água.

Esses resultados podem ser explicados pela presença de várias substâncias potencialmente citotóxicas, além do metacrilato de metil, presentes nas resinas acrílicas, tais como formaldeído, plastificantes, ácido benzóico, fenil salicilato, difenil, difenil benzoato e aditivos orgânicos[7,25,37,50,51,60,62,75] que, provavelmente, ficaram no interior da massa de resina e que somente foram difundidos no meio de cultura durante a permanência das amostras no meio por 24 horas para confecção dos extratos. Segundo Lefebvre et al.[46] diferentes substâncias podem ser liberadas pelas resinas acrílicas, e essa liberação pode ocorrer por vários dias. Além disso, a formação do formaldeído na camada superficial da amostra durante a polimerização complementar de polimerização pode ter contribuído com a citotoxicidade após 48 horas de armazenamento em água[12,62]. Campanha et al.[12] sugeriram que a citotoxicidade poderia ter ocorrido pela liberação de várias substâncias, como produtos decorrentes da reação de polimerização dos radicais livres, produtos de degradação, impurezas, aditivos ou, ainda, produtos formados pela decomposição do peróxido de benzoíla. Em seu estudo, Sadamori et al.[63] sugeriram que o monômero residual das resinas acrílicas para bases de próteses diminui com o tempo de utilização e que a maior liberação ocorre nos primeiros 5 anos. Em relação ao formaldeído, Oysaed et al.[60] mostraram que esse componente foi detectado nos compósitos dentais mesmo após 115 dias. Segundo Ruyter,[70] a liberação de formaldeído pelas resinas acrílicas pode ser a

possível causa das reações alérgicas em pacientes portadores de próteses. Lygre et al.[50] relataram que os componentes responsáveis pelo efeito citotóxico das resinas acrílicas ainda não foram totalmente identificados e que algumas substâncias, tais como o fenil salicilato, são decorrentes de reações envolvendo os radicais livres do peróxido de benzoíla, iniciador do processo de polimerização da resina.

Além disso, outra explicação para o aumento da citotoxicidade após 48 horas de armazenamento é que, quando as resinas são imersas em água, o conteúdo de monômero residual presente no material polimerizado pode ser liberado, processo esse facilitado quando a água é aquecida[76]. Simultaneamente, moléculas de água são absorvidas pela resina[4]. Tem sido verificado, também, que a presença de agentes de ligação cruzada na composição das resinas acrílicas termicamente ativadas (etilenoglicol dimetacrilato) diminui a absorção de água[4]. Esses fenômenos dependem do tempo e, dessa forma, o conteúdo de moléculas de monômero residual e de água na estrutura polimérica é alterado durante o armazenamento até que o equilíbrio seja atingido. Portanto, o equilíbrio entre absorção de água e difusão das substâncias potencialmente citotóxicas pode ter ocorrido mais lentamente para as resinas QC 20 com ou sem tratamento e Acron MC sem tratamento térmico, tendo sido liberadas substâncias tóxicas no meio de cultura durante a permanência das amostras no meio por 24 horas para a

confecção dos extratos, mesmo após 48 horas de armazenamento em água.

Outro aspecto importante a ser considerado neste estudo é o comportamento da resina Lucitone 550, cuja citotoxicidade se manteve inalterada para as amostras com ou sem tratamento de polimerização complementar em microondas e para todos os tempos de armazenamento em água (0, 24 ou 48 horas). Esses resultados ressaltam a importância do correto processamento e da adequada polimerização das resinas acrílicas para bases de próteses, sugerindo-se o ciclo de polimerização em água à temperatura de 73^0C, por 90 minutos, seguido do aquecimento terminal por 30 minutos a 100^0C, por resultar em maior conversão do monômero em polímero[23].

Assim, de acordo com os resultados do presente estudo, fica evidente a importância do correto processamento do material e da análise citotóxica para comparação entre as resinas. Porém, estudos futuros são necessários para detectar, quantificar e qualificar as substâncias liberadas pelas resinas acrílicas para bases e reembasamento de próteses bem como para determinar o efeito citotóxico dessas substâncias. Além disso, como os resultados dos testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas[15], pesquisas clínicas in vivo também são sugeridas.

7 Conclusão

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

1- o tratamento térmico em microondas diminuiu a citotoxicidade do material reembasador Tokuyama Rebase II;

2- no tempo 0, a resina Tokuyama Rebase II sem tratamento e a resina Acron MC com ou sem tratamento térmico em microondas foram classificadas como discretamente citotóxicas. Neste tempo, as demais resinas foram classificadas como não citotóxicas;

3- após 24 horas de armazenamento em água, todos os materiais, com ou sem tratamento térmico em microondas, foram classificados como não citotóxicos;

4- após 48 horas de armazenamento em água, a resina Acron MC sem tratamento e a resina QC 20 com ou sem tratamento foram classificadas como discretamente citotóxicas. A resina Lucitone 550 foi classificada como não citotóxica para ambos os grupos.

8 Referências *

1. AL DOORI, D.; HUGGETT, R.; BATES, J.F. A comparison of denture base acrylic resins polymerized by microwave irradiation and by conventional water bath curing systems. **Dent. Mater.,** Copenhagen, v.4, n.1, p.25-32, Feb. 1988.
2. ALI, A. et al. The burning mouth sensation related to the wearing of acrylic dentures: an investigation. **Br. Dent. J.,** London, v.161, n.12, p.444-447, Dec. 1986.
3. ANUSAVICE, K.J. Resina para base de dentadura In: _____. **Phillips materiais dentários.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, cap.11, p.140-160.
4. ARIMA, T.; MURATA, H.; HAMADA, T. Analysis of composition and structure of hard autopolymerizing reline resins. **J. Oral Rehabil.,** Oxford, v.23, n.5, p.346-352,May. 1996.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: i**nformação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

5. AUSTIN, A.T.; BASKER, R.M. The level of residual monomer in acrylic denture materials with particular reference to a modified method of analysis. **Br. Dent. J.**, London, v.18, n.10, p.281-286, Nov. 1980.
6. AXELSSON, B.; NYQUIST, G. The leaching and biological effect of the residual monomer of methyl methacrylate **Odontol. Revy,** Lund, v.13, p.370-379, 1962.
7. BARBOSA, C.M.R. et al. Uso de la energía de microondas en el procesamiento de prótesis odontológicas. **Rev. Asoc. Odontol. Argent.,** Buenos Aires, v.86, n.2, p.105-108, Marzo/Abr. 1998.
8. BARRON, D.J. et al. Biocompatibility of visible light-polymerized denture base resins. **Int. J. Prosthodont.,** Lombard, v.6, n.5, p.495-501, Sept./Oct. 1993.
9. BARTOLONI, J.A. et al. Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques. **J. Oral Rehabil.,** Oxford, v.27, n.6, p.488-493, June 2000.
10. BLAGOJEVIC, V.; MURPHY, V.M. Microwave polymerization of denture base materials. A comparative study. **J. Oral Rehabil.,** Oxford, v.26, n.10, p.804-808, Oct. 1999.

11. BRAUN, K.O.; DEL BEL CURY, A.A.; CURY, J.A. Avaliação in vitro da efetividade de polimerização da resina acrílica dental polimerizada através de energia de microondas, quando em contato com metal. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo,** São Paulo, v. 12, n.2, p. 173-180, Abr./Jun. 1998.

12. CAMPANHA, N.H. et al. Cytotoxicity of hard chair-side reline resins: effect of microwave irradiation and water-bath post-polymerization treatments. **Int. J. Prosthodont.,** Lombard, 2005. No prelo.

13. CIMPAN, M.R. et al. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. **Eur. J. Oral Sci.,** Copenhagen, v.108, n.1, p.59-69, Feb. 2000.

14. CIMPAN, M.R. et al. The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. **Acta Odontol. Scand.,** Stockholm, v.58, n.5, p.217-228, Oct. 2000.

15. COSTA, C.A.S. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: ESTRELA, C. **Metodologia científica:** ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo, Artes Médicas, 2001. cap.9, p.145-160.

16. COSTA, C.A.S.; EDWARDS, C.A.; HANKS, C.T. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. **Am. J. Dent.,** San Antonio, v.14, n.1, p.25-30, Feb. 2001.

17. CRAIG, R.G. Prosthetics applications of polymers. In: ____. **Restorative dental materials.** 10.ed. St. Louis: Mosby, 1997. cap.19, p.500-551.

18. CRAIG, R.G.; O'BRIEN, W.; POWERS, J.M. Plastics in prosthetics In: _____. **Dental materials:** properties and manipulation. 5.ed. St. Louis, Mosby, 1992. cap.13, p.267-292.

19. DE CLERCK, J.P. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.57, n.5, p.650-658, May 1987.

20. DOGAN, A. et al. The effect of preparation condictions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption. **J. Dent.,** Bristol, v.23, n.5, p.313-318, Oct. 1994.

21. FISHER, A.A. Allergic sensitization of the skin and oral mucosa to acrylic denture materials. **J. Am. Med. Assoc.,** Chicago, v.18, n.3, p.238-242, Sept. 1954.

22. FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biol. Toxicol.,** Princenton, v.17, n.4-5, p.213-230, 2001.

23. HARRISON, A.; HUGGETT, R. Effect of the curing cycle on residual monomer levels of acrylic resin denture base polymers. **J. Dent.,** Bristol, v.20, n.6, p.370-374, Dec. 1992.

24. HENSTEN-PETTERSEN, A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. **Int. Endod. J.,** Oxford, v.21, n.2, p.89-99, Mar. 1988.

25. HENSTEN-PETTERSEN, A.; WICTORIN, L. The cytotoxic effect of denture base polymers. **Acta Odontol. Scand.,** Stockholm, v.39, n.2, p.101-106, 1981.

26. ILBAY, S.G.; GÜVENER, S.; ALKUMRU, H.N. Processing dentures using a microwave technique. **J. Oral Rehabil.,** Oxford, v.21, n.1, p.103-109, Jan. 1994.

27. IMAZATO, S. et al. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. **J. Dent.,** Bristol, v.28, n.1, p.61-67, Jan. 2000.

28. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 10993-5:1992**. Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. Ginebra**,** 1992.

29. JAGGER, R.G. Effect of the curing cycle on some properties of a polymethylmethacrylate denture base material. **J. Oral Rehabil.,** Oxford, v.5, n.2, p.151-157, Apr. 1978.

30. JEROLIMOV, V. et al. The effect of variations in the polymer/monomer mixing rations on residual monomer levels and flexural properties of denture base materials. **Quintessence Dent. Technol.,** Chicago, v.9, n.7, p.431-434, July/Aug. 1985.

31. JORGE, J.H., GIAMPAOLO, E.T., PAVARINA, A.C. Citotoxicidade dos materiais dentários. Revisão da literatura. **Rev. Odontol. UNESP.,** São Paulo, v.33, n.2, p.65-68, 2004. Disponível em <http://www.rou.hostcentral.com.br/search.php>. Acesso em 23 nov. 2005.
32. JORGE, J.H. et al. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.90, n.2, p.190-193, Aug. 2003.
33. JORGE, J.H. et al. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. **Int. J. Prosthodnt.,** Lombard, v.17, n.3, p.340-344, May/June 2004.
34. KAPUR, K.; SHKLAR, G. The effect of complete dentures on alveolar mucosa. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.13, n.6, p.1030-1037, Nov./Dec. 1963.
35. KEDJARUNE, U.; CHAROENWORALUK, N.; KOONTONGKAEW, S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. **Aust. Dent. J.,** Sydney, v.44, n.1, p.25-30, Mar. 1999.
36. KIMURA, H. et al. Applications of microwave for dental technique (part 1). Dough-forming and curing of acrylic resins. **J Osaka Univ. Dent. Sch.,** Osaka, v.23, p.43-49, 1983.

37. KODA, T. et al. Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. **Dent. Mater.,** Copenhagen, v.6, n.1, p.13-16, Jan. 1990.

38. LAI, Y.L. et al. Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. **J. Oral Rehabil.,** Oxford, v.31, n.12, p.1165-1172, Dec. 2004.

39. LAMB, D.J.; ELLIS, B.; PRIESTLEY, D. The effects of process variables on levels of residual monomer in autopolymerizing dental acrylic resin. **J. Dent.,** Bristol, v.11, n.1, p.80-88, Mar. 1983.

40. LAMB, D.J. et al. Loss into water of residual monomer from autopolymerizing dental acrylic resin. **Biomaterials,** Guildford, v.3, n.3, p.155-159, July. 1982.

41. LEE, S.Y.; LAI, Y.L.; HSU, T.S. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate. **Eur. J. Oral Sci.,** Copenhagen, v.110, n.2, p.179-183, 2002.

42. LEFEBVRE, C.A.; SCHUSTER, G.S. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.71, n.2, p.178-185, Feb. 1994.

43. LEFEBVRE, C.A.; KNOERNSCHILD, K.L.; SCHUSTER, G.S. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.72, n.6, p.644-650, Dec. 1994.

44. LEFEBVRE, C.A. et al. Effects of denture base resins on oral epithelial cells. **Int. J. Prosthodont.,** Lombard, v.4, n.4, p.371-376, July/Aug. 1991.

45. LEFEBVRE, C.A. et al. The cytotoxic effects of denture base resin selants. **Int. J. Prosthodont.,** Lombard, v.5, n.6, p.558-562, Nov./Dec, 1992.

46. LEFEBVRE, C.A. et al. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. **Int. J. Prosthodont.,** Lombard, v.8, n.2, p.122-128, Mar./Apr. 1995.

47. LEFEBVRE, C.A., et al. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.85, n.4, p.352-356, Apr. 2001.

48. LEIRSKAR, J.; HELGELAND, K. A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. **Scand. J. Dent. Res.,** Copenhagen, v.80, n.2, p.120-133, 1972.

49. LEWIS, B.B.; CHESTNER, S.B. Formaldehyde in dentistry.: a review of mutagenic and carcinogenic potential. **J. Am. Dent. Assoc.,** Chicago, v.103, n.3, p.429-434, Sept. 1981.

50. LYGRE, H.; SOLHEIM, E.; GJERDET, N.R. Leaching from denture base materials in vitro. **Acta Odontol. Scand.,** Stockholm, v.53, n.2, p.75-80, Apr. 1995.

51. LYGRE, H. et al. Leaching of organic additives from dentures in vivo. **Acta Odontol. Scand.,** Stockholm, v.51, n.1, p.45-51, Feb. 1993

52. McCABE, J.F.; BASKER, R.M. Tissue sensitive to acrylic resin: a method of measuring the residual monomer content and its clinical application. **Br. Dent. J.,** London, v.140, n.18, p.347-350, May. 1976.

53. MELLO, J.A.N. **Avaliação in vitro de propriedades mecânicas e químicas de uma resina autopolimerizável polida quimicamente, submetida a um ciclo de polimerização complementar com energia de microondas ou água quente**. 1999. 91f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1999.

54. NAGEM FILHO, H.; CHIODI NETO, J.; ARAUJO, P.A. Biocompatibility of acrylic resins implants in connective tissue. **Estomatol. Cult.,** Bauru, v.7, n.2, p.120-123, Jul./Dec. 1973.

55. NAKAMURA, M.; KAWAHARA, H. Long-term biocompatibility test of denture base resins in vitro. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.52, n.5, p.694-699, Nov. 1984.

56. NALCACI, A.; OZTAN, M.D.; YILMAZ, S. Cytotoxicity of composite resins polymerized with different curing methods. **Int. Endod. J.,** Oxford, v.37, n.2, p.151-156, Feb. 2004.

57. NISHII, M. Curing of denture base resins with microwave irradiation: with particular reference to heat-curing resins. **J. Osaka Dent. Univ.,** Osaka, v.2, n.1, p.23-40, 1968.

58. OKITA, N.; HENSTEN-PETTERSEN, A. In vitro cytotoxicity of tissue conditioners. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.66, n.5, p.656-659, Nov. 1991.

59. OLIVEIRA, V.M.B. **Influência da posição e do número de muflas no microondas sobre a liberação de monômero residual, dureza de superfície e porosidade da resina acrílica Acron MC**. 2001. Dissertação (Mestrado em Prótese) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba. 2001.

60. OYSAED, H.; RUYTER, I.E.; SJOVIKSKLEVEN, I.J. Release of formaldehyde from dental composites. **J. Dent. Res.,** Washington, v.67, p.1289-1294. 1988.

61. ROSE, E.C. et al. Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. **J. Orofac. Orthop.,** Miinchen, v.61, n.4, p.246-257, 2000.

62. RUYTER, I.E. Release of formaldehyde from denture base polymers. **Acta Odontol. Scand.,** Stockholm, v.38, n.1, p.17-27, 1980.

63. SADAMORI, S.; KOTANI, H.; HAMADA, T. The usage period of dentures and their residual monomer contents. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.68, n.2, p.374-376, Aug. 1992.

64. SADAMORI, S. Dimensional changes of relined denture bases with heat-cured, microwave-activated, autopolymerizing, and visible light-cured resins. A laboratory study. **Aust. Dent. J.,** Sydney, v.40, n.5, p.322-326, Oct. 1995.

65. SCHUSTER, G.S. et al. Relationships between denture base resin cytotoxicity and cell lipid metabolism. **Int. J. Prosthodont.,** Lombard, v.8, n.6, p.580-586, Nov./Dec. 1995.

66. SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. **Eur. J. Oral Sci.,** Copenhagen, v.104, n.3, p.292-299, June 1996.

67. SHERIDAN, P.J. et al. Cytotoxicity of denture base resins. **Int. J. Prosthodont.,** Lombard, v.10, n.1, p.73-77, Jan./Feb. 1997.

68. SHLOSBERG, S.R. et al. Microwave energy polymerization of poly(methyl methacrylate) denture base resin. **Int. J. Prosthodont.,** Lombard, v.2, n.5, p.453-458, Sept./Oct. 1989.

69. SPEALMAN, C.R. et al. Monomeric methyl methacrylate**. Indust. Med.,** v.14, p.292, 1945.

70. SPENCER, H.R.; GARIAEFF, P. The present status of vulcanite versus plastics a base plate materials. **Contact. Point.,** San Francisco, v.27, p.263-267, June 1949.

71. STAMMATI, A.P.; SILANO, V.; ZUCCO, F. Toxicology investigations with cell culture systems. **Toxicology,** Amsterdam, v.20, n.2-3, p.91-153, 1981.

72. STANFFORD, G.D.; BROOKS, S.C. The loss of residual monomer from acrylic ortodontic resins. **Dent. Mater.,** Copenhagen, v.1, n.4, p.135-138, Aug. 1985.

73. TANG, A.T.H. et al. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. **J. Biomed. Mater. Res.,** Hoboken, v. 45, n.3, p.214-222, June 1999.

74. TRUONG, V.T.; THOMASZ, F.G.V. Comparison of denture acrylic resins cured by boiling water and microwave energy. **Aust. Dent. J.,** Sydney, v.33, n.3, p.201-204, June 1988.

75. TSUCHIYA, H. et al. Flow injection analysis of formaldehyde leached from denture-base acrylic resins. **J. Dent.,** Bristol, v.21, n.4, p.240-243, Aug. 1993.

76. TSUCHIYA, H. et al. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. **J. Prosthet. Dent.,** St. Louis, v.71, n.6, p.618-624, June 1994.

77. TURNER, T.D.; SPYRATOU, O.; SCHMIDT, J. Biocompatibility of wound management products: standardization of and determination of cell growth rate in L 929 fibroblast cultures. **J. Pharm. Pharmacol.,** v.41, n.11, p.775-780, Nov. 1989.

78. UPADHYAY, P.; BHASKAR, S. Real time monitoring of lymphocyte proliferation by an impedance method. **J. Immunol. Methods,** Amsterdam, v.244, n.1-2, p.133-137, Oct. 2000.

79. VALLITTU, P.K.; RUYTER, I.E.; BUYKUILMAZ, S. Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. **Eur. J. Oral Sci.,** Copenhagen, v.106, n.1, p.588-593, Feb. 1998.

80. WAGNER, U.; BURKHARDT, E.; FAILING, K. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the ^{3}H-thymidine incorporation assay. **Vet Immunol and Immunopathol,** Amsterdam, v.70, n.3/4, p.151-159, Sept. 1999.

81. WEAVER, R.E.; GOEBEL, W.M. Reactions to acrylic resin dental prostheses **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 43, n.2, p. 138-142, Feb. 1980.

82. WENNBERG, A. Cell culture in the biological evaluation of dental materials: a review. **Altern. Lab. Anim.,** London, v.13, p.194-202, 1986.

83. WENNBERG, A.; HASSELGREN, G.; TRONSTAD, L. A method for toxicity screening oh biomaterials using cells cultured on Millipore Filters. **J. Biomed. Mater. Res.,** Hoboken, v.13, n.1, p.109-120, Jan. 1979.

84. WOELFEL, J.B.; PAFFENBARGER, G.C. Dimensional changes occurring in artificial dentures. **Int. Dent. J.,** London, v.9, p.451-460, Dec. 1959.

85. YUNUS, N.; HARRISON, A.; HUGGETT, R. Effect of microwave irradiation on the flexural strength and residual monomer levels of an acrylic resin repair material. **J. Oral Rehabil.,** Oxford, v.21, n.6, p.641-648, Nov. 1994.

Apêndice A

Tabela A1 – Composição do pó e do líquido dos materiais utilizados

Material	Pó	Líquido
Lucitone 550	Polimetil metacrilato	Metil metacrilato
QC 20	Polimetil metacrilato	Metil metacrilato
Acron MC	Polimetil metacrilato	Metil metacrilato
Tokuyama Rebase II	Polietil metacrilato	2-acetoacetoxietil metacrilato
Kooliner	Polietil metacrilato	Isobutil metacrilato
New Truliner	Polietil metacrilato	Isobutil metacrilato

Tabela A2 - Contagens células viáveis, em cintilação por minuto (cpm), obtidos pela incorporação da Timidina, para a avaliação da citotoxicidade de materiais indicados para a confecção de bases de próteses, em função de tratamentos térmicos e do tempo de armazenamento em água

Tratam	Tempo (h)	Resina	Replicatas					
ST	0	Acron	15324	14913	14589	16854	16156	16134
		Lucitone	25763	20001	24567	22868	23640	23634
		QC 20	19384	23902	22962	22443	23920	23913
		N Truliner	23816	22566	22616	24120	23247	24212
		Kooliner	25386	24449	23239	24172	25934	25044

		Tokuyama	15749	14604	14778	14965	14831	14231
	24	Acron	22458	23708	24583	23669	26187	26903
		Lucitone	25384	22826	25006	26626	22014	24654
		QC 20	22419	22393	21399	23991	25008	22629
	48	Acron	17615	20103	19821	19382	21603	17729
		Lucitone	25214	23303	24502	24415	27296	26336
		QC 20	19212	20031	19362	19635	21042	20659
MO	0	Acron	14451	12792	10149	11406	14915	13705
		Lucitone	26277	24567	24298	25193	24984	24079
		QC 20	19291	19170	18043	20281	21468	22092
		N Truliner	22093	24013	22569	24393	23844	23838
		Kooliner	25584	21409	22481	24944	24143	25287
		Tokuyama	19257	19765	18140	21306	21034	22026
	24	Acron	22195	26165	23532	24614	25327	25627
		Lucitone	24679	23404	23533	23468	22308	25488
		QC 20	23664	23997	25659	24281	24939	26388
	48	Acron	19881	21274	22771	21824	20420	22634
		Lucitone	24543	24860	22503	26158	22729	24292
		QC 20	16675	19420	19559	19723	19985	21431
Controle			26887	27172	25070	25277	30584	25241

Tabela A3 - Sumário da análise de variância para a avaliação dos efeitos de tempos de armazenamento, tratamentos térmicos e materiais sobre o número médio de células incorporadas pela Timidina

Fonte de variação	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Tempo	2	72206438,8	37,34	<0,001
Tratamento	1	1603178,0	0,83	0,364
Material	5	140541058,7	72,67	<0,001
Tempo*Tratamento	2	6976467,6	3,61	0,030
Tempo* Material	4	105476484,6	54,54	<0,001
Tratam* Material	5	22365381,0	11,56	<0,001
Tempo*Tratamento* Material	4	15293259,6	7,91	<0,001
Resíduo	125	1933915,6		

Homogeneidade de variâncias: p= 0,530 (Levene)

Normalidade dos resíduos: p= 0,707 (Shapiro-Wilk)

Resumo

JORGE, J.H. **Efeito do tratamento térmico em microondas e do tempo de armazenamento em água sobre a citotoxicidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses.** Araraquara, 2006. 189f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

A proposta do presente estudo foi avaliar, por meio do teste quantitativo de incorporação de ^{3}H-timidina, o efeito do tratamento térmico em microondas sobre a citotoxicidade de três resinas termopolimerizáveis indicadas para confecção de bases de próteses, em função do tempo de armazenamento em água, e de três resinas autopolimerizáveis indicadas para reembasamento. A hipótese de que o tratamento térmico em microondas poderia diminuir a citotoxicidade de resinas acrílicas foi avaliada. Os materiais testados foram Lucitone 550 (a mufla foi imersa em água à temperatura de 73^{0}C permanecendo por 90 minutos, em seguida, à temperatura foi elevada para 100^{0}C e a mufla mantida por mais 30 minutos), QC 20 (a mufla foi imersa em água em ebulição, o aquecimento foi mantido e a mufla permaneceu no recipiente por um período de 20 minutos contados a partir do momento em que a água atingiu novamente à temperatura de ebulição e Acron MC (a mufla foi levada ao forno de microondas durante 3 minutos à potência de 500 W) e os reembasadores Tokuyama Rebase II, Kooliner e New Truliner. Foram confeccionados, em condições asséptica, corpos-de-prova de cada resina em forma de discos medindo 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. As amostras das resinas termopolimerizáveis foram

armazenadas em água destilada por 0, 24 ou 48 horas a 37ºC. Para avaliar o efeito do tratamento térmico em microondas, os corpos-de-prova de todas as resinas foram divididos em dois grupos: 1) sem tratamento térmico e 2) com tratamento térmico em microondas, com as amostras imersas em água, irradiadas durante 3 minutos à 500 W. Os extratos das resinas foram preparados colocando-se três corpos-de-prova de cada grupo experimental, após terem recebido o tratamento térmico, em tubos de ensaio com 9 ml de meio de cultura Eagle e incubados a 37ºC por 24 horas. Um tubo de ensaio, contendo apenas 9 ml de meio de cultura, foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo. O possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelas resinas foi avaliado por meio do método de cultura de células. Para a realização do teste de citotoxicidade, 1,0 x 10^4 células/ml em meio de cultura Eagle foram colocadas em cada compartimento de uma placa com 96 orifícios e incubada em estufa com 5% de CO^2, a 37ºC por 24 horas. Após este período, o meio de cultura que alimentava as células foi descartado e, em cada orifício da placa, foram colocados 50 μl de meio de cultura novo e 50 μl do extrato contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova e incubada por 24 horas em estufa com 5% de CO^2, à temperatura de 37ºC. O teste de incorporação de ^{3}H-timidina foi utilizado para determinar a citotoxicidade dos materiais testados. Os dados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial incompleto de três fatores (tratamento térmico; material e tempo de armazenamento em

água), incluindo ainda um grupo controle, ao nível de 5% de significância. A análise de variância foi complementada pelo teste de Tukey. Os resultados também foram avaliados de acordo com a ISO-standard 10993-5, a qual descreve os métodos in vitro para a análise da citotoxicidade. Os resultados deste estudo demonstraram que o tratamento térmico em microondas melhorou a biocompatibilidade apenas da resina Tokuyama Rebase II. Esse tratamento não diminuiu a citotoxicidade dos demais materiais. No tempo 0, a resina Tokuyama Rebase II sem tratamento e a resina Acron MC para ambos os grupos experimentais foram classificadas como discretamente citotóxicos. Os outros materiais foram graduados como não-citotóxicos. Após 24 horas de armazenamento em água, todos os materiais foram classificados como não-citotóxicos. Após 48 horas, a resina Acron MC sem tratamento e a resina QC 20 com ou sem tratamento térmico foram graduadas discretamente citotóxicos. A resina Lucitone 550 foi classificada como não-citotóxica para todos os grupos experimentais. Com base nos resultados, pôde-se concluir que o tratamento térmico em microondas diminuiu a citotoxicidade apenas da resina Tokuyama Rebase II.

Palavras-chave: Citotoxicidade imunológica; resinas acrílicas; tratamento térmico; microondas.

Abstract

JORGE, J.H. **Effect of microwave post-polymerization heat-treatment and of the storage time on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins.** Araraquara, 2006. 189f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

The aim of the current study was to evaluate the effect of microwave post-polymerization heat-treatments and water storage time on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. The hypothesis that post-polymerization treatment could decrease the cytotoxicity of acrylic base resins was tested in this study. The materials tested were Lucitone 550 (water-bath at a temperature of 73ºC for 90 minutes, followed by 30 minutes of heating at 100ºC), QC 20 (boil water, insert flask, return to boil, boil for 20 minutes) and Acron MC (microwave-polymerized, irradiated for 3 minutes at 500 W) and the hard chair-side reline resin Tokuyama Rebase II, Kooliner and New Truliner. Sample disks of the denture base resins were fabricated under aseptic conditions in mold 10 mm in diameter by 1 mm thick. The samples of the denture base acrylic resins were stored in distilled water for 0, 24 and 48 hours at 37ºC. To assess the biologic effect of the heat-treatment on the denture resins, samples fabricated were further divided into two groups: 1) samples without heat-treatment; and 2) sample were treated in microwave, immersed in water, irradiated for 3 minutes at 500 W. Eluates of the materials were prepared by placing three disks into a sterile glass

vial with 9 ml of Eagle's medium supplemented with antibiotics and fetal bovine serum. These were incubated for 24 hours at 37ºC. Medium without disks was also incubated and diluted as above to serve as the control. L929 mouse fibroblasts (1 x 10^4 cell/ml) were cultivated in Eagle's medium supplemented with antibiotics and fetal bovine serum in 96 well culture plates and incubated for 24 hours at 37ºC in an air atmosphere containing 5% CO_2. After 24 hours of incubation, the culture medium was replaced by 50 μl of eluate and 50 μl of fresh medium were added to each well of the 96-well culture plate and incubated for more 24 hours at 37ºC in an air atmosphere containing 5% CO_2. The ^{3}H-thymidine incorporation was used to determine the cytotoxicity of the materials tested. Statistical analysis of the data was performed by use of incomplete three-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD tests ($p<0.05$). The results also were evaluated in accordance with ISO-standard 10993-5 (part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods). The results of the study demonstrate that microwave post-polymerization heat-treatment only improved the biocompatibility of the Tokuyama Rebase II. The heat-treatment did not decrease the cytotoxicity the other materials tested. Tokuyama Rebase II without heat-treatment and Acron MC for both experimental groups were gradually as slight cytotoxic to the group without water storage. The other resins were gradually as non-cytotoxic. After 24 hours of immersion in water, all materials were gradually as non-cytotoxic. After water storage for 48 hours, the Acron MC without heat-

treatment and QC 20 for both experimental groups were gradually as slight cytotoxic. The acrylic resin Lucitone 550 was gradually as no cytotoxic for all experimental groups. It has been concluded that the microwave post-polymerization heat-treatment only improved the biocompatibility of the Tokuyama Rebase II.

Keywords: Immunologic cytotoxicity; acrylic resins; heat-treatment; microwave.